

黄正洋, 王钱保, 黄华云, 等. 鸡 *let-7b* 在不同生长时期及不同组织中的表达及其生物信息学分析与靶基因预测[J]. 江苏农业学报, 2022, 38( 2 ): 429-437.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2022.02.017

## 鸡 *let-7b* 在不同生长时期及不同组织中的表达及其生物信息学分析与靶基因预测

黄正洋, 王钱保, 黄华云, 李春苗, 穆春宇, 黎寿丰, 赵振华  
( 中国农业科学院家禽研究所, 江苏 扬州 225009 )

**摘要:** 为探究 *let-7b* 在鸡不同生长时期和不同组织中的表达规律及生物信息学特点, 以苏禽 3 号肉鸡为试验材料, 检测鸡 *let-7b* 在不同时期和不同组织中的表达变化, 通过生物信息学工具对常见脊椎动物的 *let-7b* 序列特点及基因组定位进行分析, 构建系统进化树, 并对靶基因进行预测。结果表明, 在鸡大脑、心、胸肌和腿肌中, *let-7b* 的相对表达量较高, 且 90 日龄相对表达量显著高于 3 日龄。 *let-7b* 位于 1 号染色体基因间隔区, 不同物种 *let-7b* 的成熟序列同源性较高, 进化树分析结果表明, 鸡 *let-7b* 与鸟类聚为一类。靶基因预测分析共获得 263 个靶基因, 对获得的靶基因进行基因本体 (GO) 功能富集分析, 发现靶基因主要富集到蛋白质泛素化、miRNA 介导的翻译抑制和 mRNA 3'-非翻译区 (3'-UTR) 结合等方面。KEGG 通路分析发现, 靶基因主要富集到丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 通路和卵母细胞减数分裂等通路。总之, 鸡 *let-7b* 在组织中广泛表达, 物种间较为保守; 结合靶基因富集分析结果, 推测 *let-7b* 可能通过靶向 MAPK 和 TGF- $\beta$  等信号通路参与调控鸡肌肉生长及细胞增殖分化。

**关键词:** *let-7b*; 靶基因; 生物信息学; 表达分析; 鸡

**中图分类号:** S831.2      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-4440(2022)02-0429-09

## Expression of *let-7b* in different growth stages and different tissues of chicken and its bioinformatics analysis and target gene prediction

HUANG Zheng-yang, WANG Qian-bao, HUANG Hua-yun, LI Chun-miao, MU Chun-yu, LI Shou-feng, ZHAO Zhen-hua

( Poultry Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Yangzhou 225009, China )

**Abstract:** For the object of exploring the expression pattern and bioinformatics characteristics of *let-7b* in different growth stages and different tissues of chickens, Suqin 3 broiler was used as experimental animal, and the expression changes of chicken *let-7b* in different growth stages and different tissues were detected. Bioinformatics tools were used to analyze characteristics and genome location of *let-7b* sequences of common vertebrates, phylogenetic tree was constructed and target genes were predicted. The results showed that, the relative expression levels of *let-7b* in the brain, heart, pecloralis muscle and leg muscle of chickens were higher than in other tissues. The relative expression level of *let-7b* in chickens of 90 days age was significantly higher than in chickens of three days age. Gene mapping analysis revealed that, *let-7b* of chickens was located in the

intergenic region on chromosome 1, and the mature sequences of *let-7b* in different species showed high homology. Results of phylogenetic tree analysis indicated that, *let-7b* of chickens and *let-7b* of birds assembled into one category. Target gene prediction revealed that, a total of 263 target genes were obtained. Through functional enrichment analysis of gene ontology (GO) for the obtained target

收稿日期: 2021-07-26

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-41-Z05); 江苏省农业科技自主创新基金项目 [CX(20)2012]; 江苏省科技成果转化项目 (BA2019049)

作者简介: 黄正洋 (1987-), 男, 河南信阳人, 博士, 助理研究员, 主要从事家禽遗传育种研究。 (E-mail) zyhuang@qq.com

通讯作者: 赵振华, (E-mail) zzh0514@163.com

genes, it was found that, *let-7b* targeted genes were mainly enriched in protein ubiquitination, miRNA-mediated translation inhibition and mRNA 3'-untranslated region (3'-UTR) binding. KEGG pathway analysis showed that, target genes were mainly enriched in mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway, transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) signaling pathway and progesterone-mediated oocyte meiosis pathway. In conclusion, *let-7b* of chicken is widely expressed in tissues and is relatively conserved among species. Considering the results of target gene enrichment analysis, it is speculated that *let-7b* may participate in the regulation of muscle growth and cell proliferation and differentiation through signaling pathways such as targeting MAPK and TGF- $\beta$ .

**Key words:** *let-7b*; target gene; bioinformatics; expression analysis; chicken

肉鸡可以提供肌肉产品,如何提高肌肉的产量和质量,是肉鸡育种研究的重要领域之一<sup>[1]</sup>。近年来,在肉鸡饲料配方没有突破性改进的情况下,对于肉鸡肌肉生长的研究主要集中在功能基因的研究上。多个调控肌肉生长的功能基因被克隆出来,其在各个组织中的表达规律也被研究,但是对这些功能基因的调控,却缺乏深入研究<sup>[2-3]</sup>。研究相关 miRNA 在组织中的表达变化规律,对其靶基因进行预测分析,能够在生物信息学基础上深入了解相关 miRNA 的调控机制。

*let-7* 是 21 世纪初在秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 中首先发现的 miRNA,在细胞的分化、增殖和凋亡等过程中发挥着重要作用<sup>[4]</sup>。有研究表明,*let-7* 有高度的保守性、组织特异性和时空表达性<sup>[5]</sup>。目前,共发现 13 个 *let-7* 家族成员,广泛存在于动物各个组织细胞中。赫晓燕等<sup>[6]</sup>研究了成年羊驼耳部和背部皮肤组织中的 miRNA 差异,发现 *let-7b* 可能参与了皮肤和毛囊更新、生长发育及毛发生长品质的调控。吴明林等<sup>[7]</sup>利用 Solexa 测序技术从牙鲆中成功鉴定出 *let-7* 家族的 10 个成员,研究发现,*let-7* 是时序发育过程中的重要调控因子,在促进幼体向成体转变的发育过程中起着极其重要的作用。曹蕊<sup>[8]</sup>研究了 *let-7* 家族在不同类型猪卵泡中的表达变化,并通过多种试验技术验证了 *let-7* 对颗粒细胞的影响,推测 *let-7* 家族参与调控猪卵泡闭锁过程,促进颗粒细胞凋亡。江倩<sup>[9]</sup>研究了 *let-7a* 在绒山羊毛囊发育周期中的表达,发现其不同生育时期均有表达,且 *Cmyc* 和 *FGF5* 是 *let-7a* 的靶基因。目前对 *let-7* 的研究,大部分集中在其对哺乳动物卵泡颗粒细胞增殖凋亡方面,对家禽特别是鸡肌肉生长的研究还比较少。

鉴于 *let-7b* 与肌肉生长及卵母细胞增殖分化的关系密切,本研究以苏禽 3 号肉鸡为试验材料,通过文献和 miRBase 检索脊椎动物的 *let-7b* 序列,利用

Ensembl 数据库确定典型物种的 *let-7b* 在基因组中的位置,根据 *let-7b* 前体序列构建系统进化树;使用 miRmap、miRDB 和 TargetScan 网站预测 *let-7b* 靶基因,并进行基因本体 (GO) 功能富集分析和 KEGG 信号通路分析;利用 RT-qPCR 技术检测不同生长期鸡 *let-7b* 在各个组织中的表达变化,为进一步揭示 *let-7b* 在鸡骨骼肌生长及细胞增殖分化中的调控作用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

选取江苏省家禽科学研究所选育的苏禽 3 号肉鸡为试验对象,随机选取 1 日龄健康雏鸡 (母鸡) 300 羽,在相同的管理条件下饲养,自由采食与饮水,并按常规免疫程序接种。试验在江苏省家禽科学研究所邵伯试验基地进行。肉鸡 3 日龄 (生长初期) 和 90 日龄 (上市前) 时,分别随机选取 5 羽母鸡取心、肝、肾、胸肌、腿肌、大脑和卵巢等样品,液氮冷冻保存备用。

### 1.2 主要试剂与仪器

miRcute miRNA 提取分离试剂盒 (DP501)、miRcute 增强型 miRNA cDNA 第一链合成试剂盒 (KR211)、miRcute 增强型 miRNA 荧光定量检测试剂盒 (FP411) 均购自天根生化科技 (北京) 有限公司;96 孔荧光定量 PCR 板和 RNase free ddH<sub>2</sub>O、无酶枪头、离心管均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。5810R 高速离心机和 PCR 仪均购自德国 Eppendorf 公司,7500 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI Applied Biosystems 公司。

### 1.3 引物设计与合成

根据 miRbase 上鸡 *gga-let-7b* 序列 (登录号: MIMAT0026503),利用 miRNA Design V1.01 软件设计实时荧光定量引物 (加尾法),以 *U6* 为内参基因,引物均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成,引物信息如表 1 所示。

表 1 *let-7b* RT-qPCR 引物Table 1 Sequences of RT-qPCR primers for *let-7b*

引物名	登录号	引物序列 (5'→3')	退火温度 (°C)
let-7b	MIMAT0001102	CAGTGAGGTAGTAGGTTGTG	60.0
		GGTCCAGTTTTTTTTTTTAAACCA	
U6	XR_003072594	TAAGCCTGGACTGAGTAAGAGCG	60.0
		CCATATTAGAAGCCCTTTTGT	

#### 1.4 miRNA 第一链 cDNA 的反转录合成

采用 miRNA 提取分离试剂盒分别提取各组织样品总 RNA。每个样品取 3 μl 总 RNA, 采用加 A 法进行 miRNA 第一链 cDNA 的反转录, 具体步骤按试剂盒说明书进行操作。20.0 μl 反应体系为: Total RNA 2 μg, 2×miRNA RT Reaction Buffer 10.0 μl, 1×miRNA RT Enzyme Mix 2.0 μl, RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 补至 20.0 μl。反应程序为 42 °C 60 min, 95 °C 3 min。合成的 cDNA 反应液可放置于 -20 °C 保存, 以备下游荧光定量检测。

表 2 不同物种 *let-7b* 序列信息Table 2 Information of *let-7b* sequences in different species

名称	登录号	物种名称	序列 (5'→3')
<i>ami-let-7b-5p</i>	MIMAT0038003	短吻鳄 ( <i>Alligator mississippiensis</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>aca-let-7b-5p</i>	MIMAT0021694	绿蜥蜴 ( <i>Anolis carolinensis</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>abu-let-7b</i>	MIMAT0042138	慈鲷鱼 ( <i>Astatotilapia burtoni</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>bta-let-7b</i>	MIMAT0004331	牛 ( <i>Bos taurus</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>cja-let-7b</i>	MIMAT0039325	普通狨 ( <i>Callithrix jacchus</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>cfa-let-7b</i>	MIMAT0009836	家犬 ( <i>Canis familiaris</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>chi-let-7b-5p</i>	MIMAT0035882	山羊 ( <i>Capra hircus</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>cpo-let-7b-5p</i>	MIMAT0046820	豚鼠 ( <i>Cavia porcellus</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>cpi-let-7b-5p</i>	MIMAT0037598	锦龟 ( <i>Chrysemys picta</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>cgr-let-7b</i>	MIMAT0023717	灰仓鼠 ( <i>Cricetulus griseus</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>ccr-let-7b</i>	MIMAT0026190	鲤鱼 ( <i>Cyprinus carpio</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>dre-let-7b</i>	MIMAT0001760	斑马鱼 ( <i>Danio rerio</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>dno-let-7b-5p</i>	MIMAT0047477	九带犰狳 ( <i>Dasypus novemcinctus</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>dma-let-7b</i>	MIMAT0049258	狐猴 ( <i>Daubentonia madagascariensis</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>fru-let-7b</i>	MIMAT0003016	河鲀 ( <i>Fugu rubripes</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>gga-let-7b</i>	MIMAT0001102	鸡 ( <i>Gallus gallus</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>ggo-let-7b</i>	MIMAT0024077	大猩猩 ( <i>Gorilla gorilla</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>hsa-let-7b-5p</i>	MIMAT0000063	人 ( <i>Homo sapiens</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>ipu-let-7b</i>	MIMAT0029375	斑点叉尾鮰 ( <i>Ictalurus punctatus</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>mml-let-7b-5p</i>	MIMAT0006152	猕猴 ( <i>Macaca mulatta</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU

#### 1.5 *let-7b* 在鸡不同组织内的定量表达检测

采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 miRNA 荧光定量检测, 反应条件和程序按照 miRcute 增强型 miRNA 荧光定量检测试剂盒说明书操作。PCR 反应在 Applied Biosystems 7500 荧光定量 PCR 系统中进行, *U6* 作为内参基因。20.0 μl 反应体系: 2×miRcute Plus miRNA PreMix (SYBR&ROX) 10.0 μl、上游引物 1.0 μl、下游引物 0.4 μl、miRNA 第一链 cDNA 1.0 μl、50×ROX Reference Dye 1.6 μl, 加 ddH<sub>2</sub>O 补足。反应程序为 95 °C 15 min, 预变性; 94 °C 变性 20 s, 60 °C 延伸 34 s, 45 个循环; 熔解曲线分析。每个样本重复 3 次, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算 miRNA 相对表达量。

#### 1.6 *let-7b* 序列的获得

从 miRBase 22.1 (<http://www.mirbase.org/>)<sup>[10]</sup> 网站下载全部物种 miRNA 成熟序列, 筛选 *let-7b* 序列, 去除植物以及不常见物种的 miRNA 序列, 只保留脊椎动物的 miRNA 成熟序列及前体序列。 *let-7b* 序列统计结果如表 2 所示。

续表2 Continued2

名称	登录号	物种名称	序列 (5'→3')
<i>mze-let-7b</i>	MIMAT0042376	斑马宫丽鱼 ( <i>Metriacrima zebra</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>mmr-let-7b</i>	MIMAT0049187	小嘴狐猴 ( <i>Microcebus murinus</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>mdo-let-7b</i>	MIMAT0004162	短尾负鼠 ( <i>Monodelphis domestica</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>mmu-let-7b-5p</i>	MIMAT0000522	小鼠 ( <i>Mus musculus</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>nbr-let-7b</i>	MIMAT0042564	巴氏新亮丽鲷 ( <i>Neolamprologus brichardi</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>oha-let-7b-5p</i>	MIMAT0036634	眼镜王蛇 ( <i>Ophiophagus hannah</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>oni-let-7b</i>	MIMAT0042743	罗非鱼 ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>oan-let-7b-5p</i>	MIMAT0006897	鸭嘴兽 ( <i>Ornithorhynchus anatinus</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>ocu-let-7b-5p</i>	MIMAT0048078	家兔 ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>ola-let-7b</i>	MIMAT0022551	青鳉 ( <i>Oryzias latipes</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>oga-let-7b</i>	MIMAT0049620	小耳大婴猴 ( <i>Otolemur garnettii</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>oar-let-7b</i>	MIMAT0014963	绵羊 ( <i>Ovis aries</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>ppa-let-7b</i>	MIMAT0049092	倭黑猩猩 ( <i>Pan paniscus</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>ptr-let-7b</i>	MIMAT0007937	黑猩猩 ( <i>Pan troglodytes</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>pha-let-7b</i>	MIMAT0049508	狒狒 ( <i>Papio hamadryas</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>pol-let-7b-5p</i>	MIMAT0025414	牙鲆 ( <i>Paralichthys olivaceus</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>pma-let-7b-5p</i>	MIMAT0019565	海七腮鳗 ( <i>Petromyzon marinus</i> )	UGAGGUAGUAGGUUUUGUAGUU
<i>ppy-let-7b</i>	MIMAT0015722	婆罗洲猩猩 ( <i>Pongo pygmaeus</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>pnv-let-7b</i>	MIMAT0042946	维鲷 ( <i>Pundamilia nyererei</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>pbv-let-7b-5p</i>	MIMAT0038796	蟒蛇 ( <i>Python bivittatus</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>rno-let-7b-5p</i>	MIMAT0000775	褐家鼠 ( <i>Rattus norvegicus</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>ssa-let-7b-5p</i>	MIMAT0032701	大西洋鲑鱼 ( <i>Salmo salar</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>tgu-let-7b-5p</i>	MIMAT0014509	斑胸草雀 ( <i>Taeniopygia guttata</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>tni-let-7b</i>	MIMAT0003017	绿河鲷 ( <i>Tetraodon nigroviridis</i> )	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
<i>xla-let-7b-5p</i>	MIMAT0046397	非洲爪蛙 ( <i>Xenopus laevis</i> )	UGAGGUAGUAGUUUGUGUAGUU
<i>xtr-let-7b</i>	MIMAT0003550	热带爪蟾 ( <i>Xenopus tropicalis</i> )	UGAGGUAGUAGUUUGUGUAGUU

### 1.7 *let-7b* 基因定位及序列分析

采用 Ensembl 数据库的 BLAST 程序 (<http://asia.ensembl.org/index.html>), 以牛、家犬、山羊、斑马鱼、鸡、人、小鼠、家兔、绵羊和斑胸草雀等 10 个物种的 *let-7b* 前体序列作为查询序列对其基因组数据库进行搜索, 以确定 *let-7b* 在基因组染色体上的位置。选取 46 种典型物种的 46 条 *let-7b* 的成熟序列, 使用 MEGA 11.0 软件<sup>[11]</sup> (<https://www.megasoftware.net/>) 中 Clustal W 程序对 *let-7b* 基因的成熟序列进行多序列比对 (Multiple sequences alignment, MSA), 分析序列特点。

### 1.8 系统发生分析

选取 46 种典型物种的 46 条 *let-7b* 的前体序列, 使用 MEGA 11.0 软件中 Clustal W 程序进行多序列比对分析, 采用基于距离参数的邻接法 (Neigh-

bor-joining, NJ), 并自展分析 (Bootstrap) 1 000 次, 构建 *let-7b* 基因的系统进化树。

### 1.9 *let-7b* 靶基因预测及功能分析

利用 3 个在线软件 miRmap<sup>[12]</sup> (<https://mirmap.ezlab.org/>)、miRDB<sup>[13-14]</sup> (<http://www.mirdb.org/.org/>) 和 TargetScan<sup>[15]</sup> ([http://www.targetscan.org/vert\\_71/](http://www.targetscan.org/vert_71/)) 预测 *gga-let-7b* 的靶基因。选取在 3 个软件预测中至少出现 2 次的基因, 既可以防止预测到的靶基因过少无法进行后续分析, 也能够降低预测结果的假阳性。对获得的靶基因使用在线工具 DAVID<sup>[16]</sup> (<https://david.ncifcrf.gov/>) 进行 GO (Gene ontology, GO) 功能分析和 KEGG pathway (Kyoto encyclopedia of genes and genomes pathway) 富集分析。

1.10 数据处理

采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析 *let-7b* 基因在鸡不同组织中的相对表达量,每个样品重复 3 次。试验结果用平均数±标准差 (Mean±SD) 来表示。用 SPSS 26.0 软件单因素方差分析进行差异性分析,以  $P<0.05$  作为差异显著的标准,  $P<0.01$  作为差异极显著的标准。

2 结果与分析

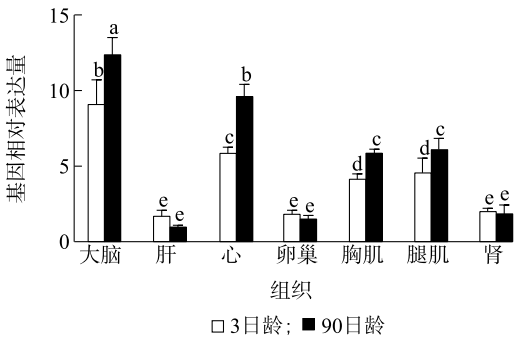
2.1 *let-7b* 在鸡不同组织中的表达检测

对鸡胸肌、腿肌、心和肝等组织中的 *let-7b* 表达变化进行了检测,结果(图 1)显示,*let-7b* 在鸡大脑、心、胸肌和腿肌中的相对表达量显著高于其他组织 ( $P<0.05$ )。对 3 日龄和 90 日龄的母鸡组织器官中 *let-7b* 表达变化进行检测,发现与 3 日龄的雏鸡相比,90 日龄鸡大脑、心、胸肌和腿肌中 *let-7b* 的相对表达量都显著上升 ( $P<0.05$ ),肝、卵巢和肾中 *let-7b* 的相对表达量差异不显著 ( $P>0.05$ )。

2.2 *let-7b* 基因定位

通过文献和 miRBase 检索共搜索 46 种脊椎动物 46 条 *let-7b* 序列,发现鸡、人、小鼠、家犬和绵羊等 46 种脊椎动物都只具有 *let-7b* 一种形式。由于家族基因命名的不同,导致 *let-7b* 呈现出以下 2 种名称变化:*let-7b* 和 *let-7b-5p*,在鸡中也只发现了一种 *let-7b* 的成

熟体。



不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。

图 1 *let-7b* 在鸡不同生长时期的相对表达量变化

Fig.1 Relative expression levels of *let-7b* gene in different growth stages of chicken

以鸡、人、小鼠和斑马鱼等 10 个物种的 *let-7b* 前体序列作为查询序列,分别对这些生物的基因组进行 BLAST 搜索,确定各序列在基因组中的位置,基因定位结果(表 3)显示,*let-7b* 家族的成员均位于基因间隔区,且主要分布在 1 号和 5 号等染色体上,大部分在过氧化物酶体增殖物激活受体基因 (*PPARA*) 和无翅型鼠乳腺肿瘤病毒 (*MMTV*) 整合位点家族成员 7B 基因 (*WNT7B*) 附近。其中鸡 *let-7b* 位于 1 号染色体上 *WNT7B* 与 *PPARA* 基因间隔区。

表 3 *let-7b* 在基因组中的定位

Table 3 Genomic location of *let-7b* gene family

物种	基因	染色体位置	基因定位
牛 ( <i>Bos taurus</i> )	<i>bta-let-7b</i>	5 号染色体	<i>WNT7B</i> 与 <i>PPARA</i> 基因间隔区
家犬 ( <i>Canis familiaris</i> )	<i>cfa-let-7b</i>	10 号染色体	<i>ATXN10</i> 与 <i>ENSCAFG00030007675</i> 基因间隔区
山羊 ( <i>Capra hircus</i> )	<i>chi-let-7b-5p</i>	5 号染色体	<i>ENSCHIG00010003116</i> 与 <i>PPARA</i> 基因间隔区
斑马鱼 ( <i>Danio rerio</i> )	<i>dre-let-7b</i>	1 号染色体	<i>PPARAA</i> 与 <i>WNT7B</i> 基因间隔区
鸡 ( <i>Gallus gallus</i> )	<i>gga-let-7b</i>	1 号染色体	<i>WNT7B</i> 与 <i>PPARA</i> 基因间隔区
人 ( <i>Homo sapiens</i> )	<i>hsa-let-7b-5p</i>	22 号染色体	<i>PPARA</i> 与 <i>PRR34</i> 基因间隔区
小鼠 ( <i>Mus musculus</i> )	<i>mmu-let-7b-5p</i>	15 号染色体	<i>WNT7B</i> 与 <i>GM34622</i> 基因间隔区
家兔 ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )	<i>ocu-let-7b-5p</i>	14 号染色体	<i>ENSOCU00000036124</i> 与 <i>PPARA</i> 基因间隔区
绵羊 ( <i>Ovis aries</i> )	<i>oar-let-7b</i>	3 号染色体	<i>ENSOARG00000021848</i> 和 <i>ENSOARG00000019427</i> 基因间隔区
斑胸草雀 ( <i>Taeniopygia guttata</i> )	<i>tgu-let-7b-5p</i>	1A 号染色体	<i>PPARA</i> 与 <i>WNT7B</i> 基因间隔区

2.3 *let-7b* 序列分析

选取 46 种典型物种的 46 条 *let-7b* 的成熟序列进行多序列比对分析,结果如图 2 所示,*let-7b* 的成熟序列同源性很高,序列长度相近,均为 21~22 nt,

保守的碱基数 18 个,分别为第 1~11 位碱基、第 13~14 位碱基、第 16~18 位碱基以及第 20~21 位碱基,说明 *let-7b* 在不同物种间高度保守。图 2 显示,*let-7b* 在部分物种中第 12 位和第 15 位碱基出现了 G>U

突变,在第 19 位碱基出现了 G>A 突变,在第 22 位末端的碱基存在不同程度的缺失。

	*****	**	***	***
1.hsa-let-7b-5p	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
2.mmu-let-7b-5p	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
3.rno-let-7b-5p	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
4.gga-let-7b	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
5.dre-let-7b	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
6.fru-let-7b	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
7.tni-let-7b	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
8.xtr-let-7b	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
9.mdo-let-7b	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
10.bta-let-7b	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
11.oan-let-7b-5p	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
12.mml-let-7b-5p	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
13.ptr-let-7b	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
14.cfa-let-7b	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
15.tgu-let-7b-5p	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
16.oar-let-7b	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
17.ppy-let-7b	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
18.pma-let-7b-5p	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
19.aca-let-7b-5p	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
20.ola-let-7b	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
21.cgr-let-7b	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
22.ggo-let-7b	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
23.pol-let-7b-5p	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
24.ccr-let-7b	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
25.ipu-let-7b	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
26.ssa-let-7b-5p	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
27.cpi-let-7b-5p	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
28.ami-let-7b-5p	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
29.pbv-let-7b-5p	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
30.chi-let-7b-5p	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
31.oah-let-7b-5p	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
32.cja-let-7b	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
33.abu-let-7b	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
34.mze-let-7b	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
35.nbr-let-7b	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
36.oni-let-7b	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
37.pny-let-7b	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
38.xla-let-7b-5p	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
39.cpo-let-7b-5p	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
40.dno-let-7b-5p	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
41.ocu-let-7b-5p	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
42.ppa-let-7b	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
43.mmr-let-7b	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
44.dma-let-7b	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
45.pha-let-7b	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		
46.oga-let-7b	UGAGGUAGUAGG	UUGUGUGUU		

“\*”表示序列一致,“-”表示碱基缺失,1~46 表示序号。

图 2 *let-7b* 的成熟序列比对

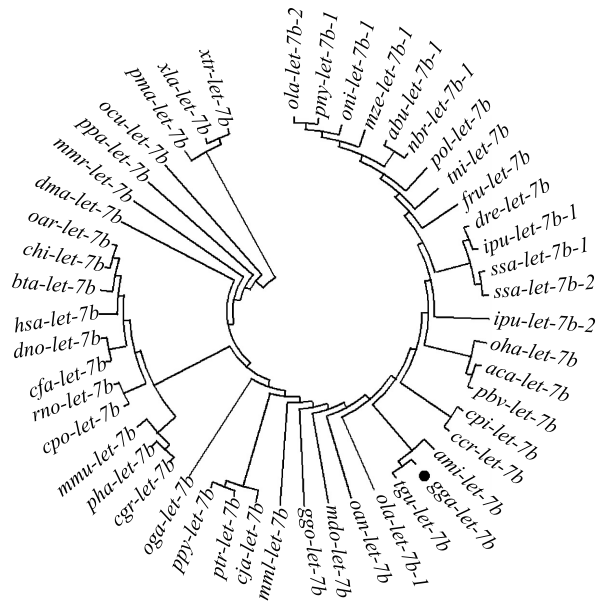
Fig.2 Alignment of mature sequence of *let-7b* gene family

## 2.4 *let-7b* 系统进化树的构建

采用 MEGA 11.0 软件,以代表性物种的 *let-7b* 序列构建基于距离参数的邻接法系统发育进化树。结果(图 3)显示,*let-7b* 基因主要分布于哺乳类、鸟类、鱼类和两栖类动物中,而鸡的 *let-7b* 与斑胸草雀等其他鸟类聚为一类,哺乳动物的 *let-7b* 独自聚为一类。这表明 *let-7b* 基因在鸟类、鱼类和哺乳动物中广泛存在。

## 2.5 *let-7b* 靶基因预测及功能分析

使用 3 种 miRNA 在线靶基因预测软件(miRDB、TargetScan 和 miRmap)分别预测到 564 个、360 个和 717 个 *gga-let-7b* 靶基因,取 3 个软件

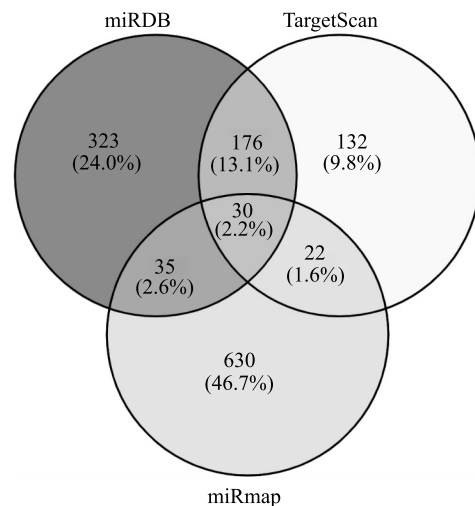


图中各个物种 *let-7b* 名称见表 2。

图 3 基于距离参数的邻接法构建 *let-7b* 系统发育进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of the *let-7b* gene family constructed based on Neighbor-Joining method

预测结果中至少出现 2 次的基因,并集后共得到 263 个靶基因(图 4)。



括号外数据为靶基因数,括号内数据为靶基因数占总基因数的比例。

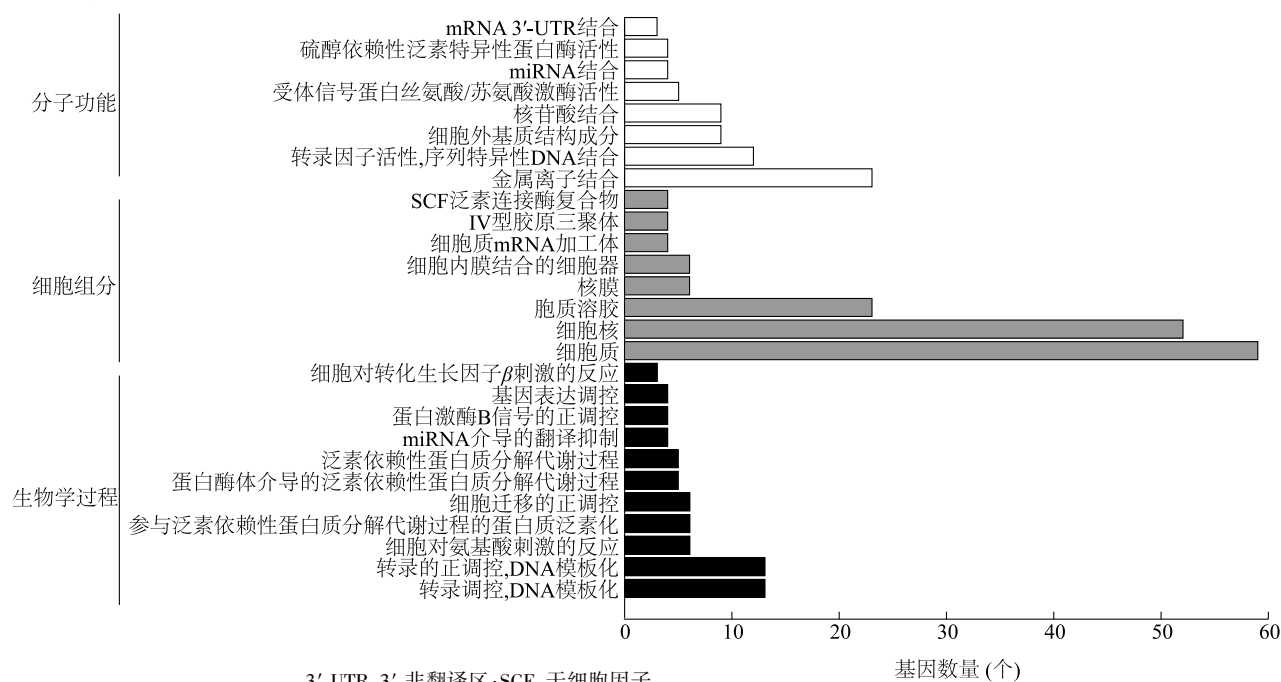
图 4 *gga-let-7b* 靶基因预测分析

Fig.4 Prediction of *gga-let-7b* target genes

对预测获得的靶基因使用在线工具 DAVID 进行 GO 功能富集分析,结果如图 5 所示。在生物学过程分类中,靶基因主要富集到 DNA 模板的转录调控、细胞对氨基酸刺激的反应、泛素依赖性蛋白质分

解代谢过程、蛋白质泛素化、细胞迁移的正调控、miRNA 介导的翻译抑制、蛋白激酶 B 信号的正调控、基因表达调控和细胞对转化生长因子 $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 刺激的反应等过程。在细胞组分分类中,靶基因主要富集到细胞质、细胞核、核膜、细胞内膜结合的细胞器、细胞质 mRNA 加工体、IV 型胶原三聚体和干细胞因子(SCF)泛素连接酶复合物中。在分子功能分类中,靶基因主要富集到金属离子结合、转录因子

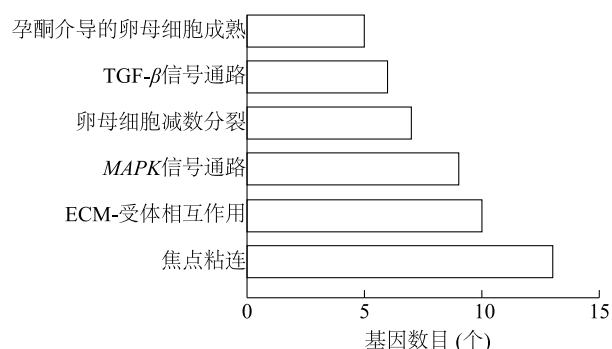
活性(序列特异性 DNA 结合)、细胞外基质结构成分、核苷酸结合、受体信号蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性、miRNA 结合和 mRNA 3'-非翻译区(3'-UTR)结合等分子功能。对靶基因进行 KEGG pathway 富集分析,结果如图 6 所示,靶基因主要富集到焦点粘连、细胞外基质受体的相互作用、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路、卵母细胞减数分裂、TGF- $\beta$  信号通路和孕酮介导的卵母细胞成熟等通路。



3'-UTR; 3'-非翻译区; SCF; 干细胞因子。

图 5 *gga-let-7b* 靶基因基因本体 (GO) 注释分析

Fig.5 Gene ontology (GO) annotation analysis of *gga-let-7b* target genes



TGF- $\beta$ : 转化生长因子 $\beta$ ; MAPK: 丝裂原活化蛋白激酶; ECM: 细胞外基质。

图 6 *gga-let-7b* 靶基因 KEGG 通路富集分析

Fig.6 Pathway enrichment analysis of *gga-let-7b* target genes

### 3 讨论

*let-7b* 是 *let-7* 家族的重要成员之一, *let-7* 家族

成员在颗粒细胞的闭锁及细胞凋亡过程中发挥着重要作用,所以 *let-7b* 在这个过程中也发挥着重要的功能。众所周知,miRNA 是一种起调控作用的内源性基因,参与了多种调控过程。先前的研究发现,miRNA 主要是通过序列中的种子序列与靶基因的 3'UTR 碱基互补配对,从而发挥调控功能。

罗文<sup>[17]</sup>通过筛选参与调控鸡成肌细胞增殖和分化的候选 miRNAs,发现 *let-7b* 和 miR-128 的表达以及 MAPK 通路活性在不同类型骨骼肌中存在显著差异。赵博文<sup>[18]</sup>基于公开的鱼类小 RNA 组信息,系统分析了鱼类 *let-7* 的系统进化,并以团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 为研究对象,探讨了 *let-7* 对鱼类生长和性腺发育的表达调控作用,结果发现 *let-7a/b* 在团头鲂不同发育时期卵巢、脑和垂体中表达量最高, *let-7a/b* 在团头鲂性腺发育过程中可

能扮演着重要角色。路璐等<sup>[19]</sup>对鹅不同生殖周期内的 *let-7* 表达变化以及基因序列进行了分析, 结果发现 *let-7g* 与 *let-7h* 在就巢期的表达量显著高于其他时期, 说明 *let-7* 在鹅生殖周期内有着一定的调节作用。王建蒙等<sup>[20]</sup>以内蒙古绒山羊皮肤为试验材料, 探索了褪黑激素 (MT) 对 *let-7* 家族成员及其靶基因周期性表达的影响, 发现褪黑激素可通过影响 *let-7* 家族重要成员的表达水平, 进而在皮肤毛囊的周期性生长过程中发挥重要作用。在本研究中, 对鸡胸肌、腿肌、心和肝等组织的 *let-7b* 表达变化进行了检测, 结果发现 *let-7b* 在鸡大脑、心、胸肌和腿肌中的相对表达量高于其他组织。对 3 日龄和 90 日龄的母鸡组织器官中 *let-7b* 的相对表达量进行检测, 发现与 3 日龄的雏鸡相比, 90 日龄母鸡的大脑、心、胸肌和腿肌中 *let-7b* 相对表达量都显著上升, 肝、卵巢和肾脏中 *let-7b* 的相对表达量差异不显著。这表明, 在鸡生长发育的早期, 新陈代谢活动旺盛, 抑制因素较少; 但是到了生长发育的中期, 个体已经到达成熟期, 有多个因素制约生长发育活动, 此时 *let-7b* 表现为高表达。

目前, 已经发现 *let-7b* 存在于不同的物种之中, 有多个靶基因, 如 *GHR*<sup>[21]</sup>、*IGF2BP3*<sup>[22]</sup>、*EDA*<sup>[23]</sup>、*TGFBR I*<sup>[24]</sup>、*PenkI*<sup>[25]</sup>、*MAP3K1*<sup>[26]</sup> 和 *FGF5*<sup>[27]</sup> 等。这表明, *let-7b* 可能具有多个靶基因, 其作用的发挥可能是通过作用多个靶基因, 从而从多个通路来调控细胞增殖、凋亡的过程。

生物信息学分析发现, 在 46 种常见的脊椎动物中共发现 46 条 *let-7b* 序列, 也就是说几乎所有物种都只有 1 条成熟序列; 对 *let-7b* 进行基因定位分析, 发现鸡 *let-7b* 位于 1 号染色体上的 *PPARA* 与 *WNT7B* 基因间隔区。结构决定功能, 这说明 *let-7b* 的功能正常发挥, 可能与 *PPARA* 与 *WNT7B* 基因关联密切。常见物种 *let-7b* 成熟序列多序列比对分析结果表明, 不同物种 *let-7b* 的序列较为保守, 这表明 *let-7b* 可能发挥着重要的生理功能。进化树分析结果表明, 鸡 *let-7b* 与斑胸草雀等其他鸟类聚为一类, 这表明 *let-7b* 在鸟类进化过程中是保守的。 *let-7b* 靶基因预测和功能分析发现共有 263 个靶基因。GO 功能富集分析结果表明, 靶基因主要富集到 DNA 模板的转录调控、细胞对氨基酸刺激的反应、泛素依赖性蛋白质分解代谢过程、蛋白质泛素化、细胞迁移的正调控、miRNA 介导的翻译抑制、蛋白激

酶 B 信号的正调控、基因表达调控和细胞对 TGF- $\beta$  刺激的反应等生物学过程, 细胞质 mRNA 加工体、IV 型胶原三聚体和 SCF 泛素连接酶复合物等细胞组分, 金属离子结合、转录因子活性 (序列特异性 DNA 结合)、受体信号蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性、miRNA 结合和 mRNA 3'-UTR 结合等分子功能。KEGG pathway 分析结果表明, 靶基因主要富集到焦点粘连、细胞外基质受体的相互作用、MAPK 信号通路、卵母细胞减数分裂、TGF- $\beta$  信号通路和孕酮介导的卵母细胞成熟等通路。这些通路均与细胞增殖分化密切相关。本研究首次研究了 *let-7b* 在鸡不同生长阶段和不同组织中的表达规律, 并对其进行了生物信息学分析, 预测了其在鸡肌肉生长过程中的功能, 但是 *let-7b* 的作用机制及其靶基因的靶向关系验证尚待进一步的试验研究。

#### 参考文献:

- [1] 文 杰. 我国黄羽肉鸡品种改良最新进展及未来发展方向[J]. 饲料与畜牧, 2019(8): 22-25.
- [2] 辛翔飞, 郑麦青, 文 杰, 等. 2020 年我国肉鸡产业形势分析、未来展望与对策建议[J]. 中国畜牧杂志, 2021, 57(3): 217-222.
- [3] 赵桂苹. 肉鸡种业技术发展趋势[J]. 北方牧业, 2021(11): 23.
- [4] SU J, CHEN P, JOHANSSON G, et al. Function and regulation of *let-7* family microRNAs[J]. Trends in cell biology, 2012, 18(10): 505-516.
- [5] ROUSH S, SLACK F J. The *let-7* family of microRNAs[J]. Trends in cell biology, 2008, 18(10): 505-516.
- [6] 赫晓燕, 郝欢庆, 刘丹丹, 等. 青年羊驼耳部和背部皮肤组织中 miRNA 差异表达研究[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2010, 26(11): 1016-1022.
- [7] 吴明林, 施志仪, 付元帅, 等. *Let-7d* 在牙鲆变态发育期间的表达及靶基因预测[J]. 上海海洋大学学报, 2012, 21(3): 344-350.
- [8] 曹 蕊. *Let-7* 家族 miRNA 调控猪卵泡闭锁的分子机制研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
- [9] 江 倩. *miR-let-7a* 在辽宁绒山羊毛囊发育周期中的差异表达及其靶基因功能鉴定[D]. 长春: 吉林大学, 2015.
- [10] KOZOMARA A, BIRGAOANU M, GRIFFITHS-JONES S. Mirbase: from microRNA sequences to function[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(1): 155-162.
- [11] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. Molecular Biology and Evolution, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [12] VEJNAR C E, ZDOBNOV E M. miRmap: Comprehensive prediction of microRNA target repression strength[J]. Nucleic Acids Re-

- search, 2012, 40(22): 11673-11683.
- [13] CHEN Y, WANG X. Mirdb: an online database for prediction of functional microRNA targets[J]. Nucleic Acids Research, 2020, 48(1): 127-131.
- [14] LIU W J, WANG X W. Prediction of functional microRNA targets by integrative modeling of microRNA binding and target expression data[J]. Genome Biology, 2019, 20(1): 18.
- [15] AGARWAL V, BELL G W, NAM J W, et al. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs[J]. eLIFE, 2015, 4: e05005.
- [16] JIAO X, SHERMAN B T, HUANG D W, et al. DAVID-WS: a stateful web service to facilitate gene/protein list analysis[J]. Bioinformatics, 2012, 28(13): 1805-1806.
- [17] 罗文. miRNAs介导的信号通路对鸡成肌细胞增殖和分化的调控[D]. 广州:华南农业大学, 2016.
- [18] 赵博文. 鱼类 *let-7* 家族的系统进化及表达与团头鲂生长和性腺发育的相关性研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2017.
- [19] 路璐, 顾天天, 刘然, 等. *let-7* 基因家族序列分析及其在鹅生殖周期内的表达变化[J]. 农业生物技术学报, 2018, 26(9): 1557-1566.
- [20] 王建蒙, 付绍印, 丽春, 等. 褪黑激素对内蒙古绒山羊皮肤中 *let-7* 家族及其靶基因的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2019, 50(7): 1367-1379.
- [21] 刘咸, 刘桑, 岳孝亭, 等. 鸡 miRNA *let-7b* 靶向调控 *GHR* 基因的双荧光素酶验证[J]. 中国家禽, 2019, 41(5): 11-15.
- [22] 岳孝亭, 刘桑, 杨承忠, 等. *let-7b* 介导 *IGF2BP3* 表达抑制鸡成肌细胞增殖效果的研究[J]. 家畜生态学报, 2018, 39(2): 12-17.
- [23] 刘宁. *let-7b* 通过下调靶基因 *EDA* 调控羊驼毛发生长的研究[D]. 太原:山西农业大学, 2016.
- [24] 申艳. *let-7b* 通过其靶基因 *TGFBR1* 调控羊驼毛生长的研究[D]. 太原:山西农业大学, 2015.
- [25] 李蒙. *let-7b* 通过靶向 *Penk1* 基因调控大鼠电针耐受[D]. 武汉:华中农业大学, 2018.
- [26] 杨娟. *let-7b* 过表达通过 *MAP3K1* 靶基因调节绵羊 FGC 的凋亡与增殖[D]. 兰州:西北民族大学, 2020.
- [27] 王婷. *let-7b* 介导 *FGF5* 表达调控羊驼毛生长的研究[D]. 太原:山西农业大学, 2014.

(责任编辑:陈海霞)