

家蚕 Argonaute2 的表达分析及其 结合 RNA 的初步研究

张 玉^{a,b}, 洪叶挺^{a,b}, 盛 清^{a,b}, 陈 健^{a,b}, 于 威^{a,b}, 王 丹^{a,b},
吴祥甫^{a,b}, 张耀洲^{a,b}, 聂作明^{a,b}

(1. 浙江理工大学, a. 生命科学学院; b. 浙江省家蚕生物反应器和生物医药重点实验室, 杭州 310018)

摘 要: 从家蚕 cDNA 文库中扩增到家蚕 *BmAGO2* 基因完整的 ORF 序列, 通过 Lasergene 软件分析获得 *BmAGO2* 的抗原表位区(命名为 *Kago2*), 构建含 *Kago2* 的表达载体, 转化大肠杆菌诱导表达, 融合蛋白经镍柱亲和层析纯化后免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体, ELISA 和 Western blotting 检测抗血清的效价可达到 1:25 600 以上, 抗体特异性较好。表达谱分析结果显示, *BmAGO2* 蛋白在家蚕卵期、蛹期、蛾期和五龄幼虫期均表达, 但在蛹期表达量要偏低。而在五龄幼虫各组织中 *BmAGO2* 蛋白的表达差异较明显, *BmAGO2* 蛋白在头部和表皮中大量表达, 丝腺、马氏管和脂肪中也有少量表达, 而在血淋巴、气管和中肠中未检测到该蛋白的表达。结合 *BmAGO2* 表达谱分析结果, 进一步利用其抗体通过免疫共沉淀方法从 *BmAGO2* 蛋白表达量高的家蚕头部和表皮中分离出 *BmAGO2* 蛋白及结合的 RNA, 并逆转录成 cDNA。以家蚕 miRNA 潜在的靶基因 *Bmem4*, *Bm(spl)-like*, *Bmemc*, *Bmmy*, *Bmm32* 作为检测基因, 荧光定量 PCR 分析获得的 *BmAGO2* 结合 RNA, 和对照组 RNA 相比, *Bmem4*, *Bm(spl)-like*, *Bmemc*, *Bmmy*, *Bmm32* 基因在 *BmAGO2* 结合 RNA 中的含量分别富集了 3.93、1.31、2.4、1.31、0.97 倍。miRNA 靶位点分析表明, *Bmem4* 和 *Bmemc* 存在多个 miRNA 结合位点, 极有可能是 miRNA 的靶基因。目前还没有有效的家蚕 miRNA 靶基因高通量鉴定方法, 本实验为家蚕 miRNA 靶基因的高通量筛选提供了可靠地实验途径。

关键词: *BmAGO2*; 表达谱分析; 结合 RNA; 免疫共沉淀; miRNA 靶基因

中图分类号: Q71 **文献标志码:** A

0 引 言

MicroRNA (miRNA) 是一类由内源基因编码的长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子^[1], 它们在动植物中介导基因转录后的表达调控。RNA 沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC) 是 miRNA 行使功能过程中所不可或缺的组分, 而其中 Argonaute (AGO) 蛋白是 RISC 的核心元件。AGO 蛋白首先在植物中被发现^[2], 它们通常含有 PAZ 和 PIWI 两个功能域^[3], 主要在引

导 miRNA 或 siRNA 靶基因的识别、降解以及产物的释放, 在 miRNA 和 RNAi 的基因调控中起到了关键的作用^[4-9]。此外, 在哺乳动物的 RNAi 中, AGO2 是特异的并且起到非常关键的作用^[10]。

利用 AGO 蛋白的抗体通过免疫共沉淀的方法能将 AGO 蛋白分离出来, 同时也能将和 AGO 蛋白结合的 RNA 分子一起分离出来, 目前已经有很多文章报道了通过免疫共沉淀分离 AGO 蛋白的方法, 从 RISC 复合物中成功地分离 miRNA 及靶基因 mRNA, 成为 miRNA 靶基因高通量筛选的常用方

收稿日期: 2014-02-21

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(2011AA100603); 浙江省自然科学基金项目(LY12C06003)

作者简介: 张 玉(1990-), 女, 山西临汾人, 硕士研究生, 研究方向为家蚕功能基因组学。

通信作者: 聂作明, E-mail: wuxinzm@126.com

法^[8,11-16]。

本研究对家蚕 AGO2 (BmAGO2) 蛋白的抗原表位区片段进行原核表达、纯化并制备相应抗体,通过该抗体分析 BmAGO2 蛋白在家蚕各组织和各时期的表达谱。基于表达谱分析,进一步通过免疫共沉淀法从家蚕表达量较高的组织中分离 BmAGO2 蛋白及结合 RNA^[17,18],并进行初步鉴定。目前关于家蚕 miRNA 功能和靶基因的相关研究还很少报道,本实验将围绕家蚕 *Argonaute2* 及其结合 RNA 开展系列研究。

1 材料和方法

1.1 材料

家蚕品种为菁松×皓月一代杂交种,由浙江中奇生物药业股份有限公司提供,按常规方法饲养;*E. coli* TG1 菌株、*E. coli* BL21 (DE3) 菌株、pET-28a 质粒是由本实验室保存;雄性新西兰大白兔(约 3 kg)购自杭州师范大学实验动物中心(合格证号 SCXK-2012-0004);Taq DNA 聚合酶为 Trans 公司产品、限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I、*Sac* I 和 *Not* I 为 Fermentas 公司产品;pMD18-T Vector 为 Takara 公司产品;蛋白胨和酵母提取物购自英国 Oxoid 公司;X-gal、IPTG、Kanamycin、Ampicillin 购自上海生工生物有限公司;质粒提取试剂盒和产物回收试剂盒为 Promega 公司产品;辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG 购自北京鼎国生物技术有限公司;其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析

用 BLAST 在线分析软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)进行基因的核酸序列和氨基酸序列的比对分析;利用 Lasergene 软件进行核酸序列分析,包括开放阅读框的查找和蛋白氨基酸序列的理化性质分析等;通过 Expasy 的 Protscale (<http://www.expasy.org>)在线分析预测蛋白疏水性。

1.2.2 重组质粒的构建及鉴定

根据 *BmAGO2* 基因的 ORF 框序列设计正向引物 Pf₁ 和反向引物 Pr₁,分别包含 *Sac* I 酶切位点、*Not* I 酶切位点。具体序列如下:

Pf₁: 5'-CGGAGCTCATGGCTAGAGGAAAAACA-3'

(下划线为 *Sac* I 酶切位点)。

Pr₁: 5'-CGCGCGGCCGCTTAGACGAAGAA

CATAC-3'

(下划线为 *Not* I 酶切位点)。

以本实验室的家蚕 cDNA 为模板,用 Fx 高保真酶进行 PCR 扩增,PCR 产物回收后使用加 A 试剂盒 (Takara 公司) 在序列的 3' 加 A,然后连接到 pMD-18-T Vector 上,转化 *E. coli* TG1 感受态细胞涂平板进行蓝白斑筛选。挑取白斑培养后提取质粒通过酶切和 PCR 酶切鉴定。

通过 Lasergene 软件获得 BmAGO2 的抗原表位区并将其命名为 Kago2,根据其序列设计正向引物 Pf₂ 和反向引物 Pr₂,分别包含 *Bam*HI 酶切位点、*Xho*I 酶切位点。具体序列如下:

Pf₂: 5'-GGATCCGTTGCACACAAAGGTTTCC-3'

(下划线为 *Bam*H I 酶切位点)。

Pr₂: 5'-GCTCGAGTTACCATACTCCCTTCTTTGG-3'

(下划线为 *Xho* I 酶切位点)。

以鉴定重组成功的 BmAGO2-pMD-18-T Vector 为模板,进行 PCR 扩增,将目的片段 *Kago2* 克隆到 pET-28a 表达载体后转化 *E. coli* BL21 (DE3) 表达菌株中。培养后提取质粒,通过 PCR、酶切及测序进行鉴定后,选取阳性重组质粒进行诱导表达。

1.2.3 融合蛋白的表达纯化及多克隆抗体的制备

BL21 (DE3)-pET-28a-Kago2 接种于 LB 培养基中,在 37℃ 生长培养到 OD₆₀₀ 值约为 0.5 左右时,加入 IPTG 至终浓度 1 mM 诱导融合蛋白表达。将诱导表达后的菌体超声破碎,SDS-PAGE 分析该融合蛋白的表达是以包涵体形式。收集大量菌体纯化融合蛋白,纯化后的融合蛋白经 SDS-PAGE 检测后透析除盐,然后进行冷冻干燥。

纯化后的 Kago2 融合蛋白免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体,免疫完成后获得兔抗血清用 Protein A 凝胶柱进行纯化;用间接 ELISA 方法测定该抗体的效价^[19];并且用 Western blotting 方法鉴定该抗体的特异性。

1.2.4 BmAGO2 在家蚕中的表达谱分析

解剖家蚕五龄虫得到了头部、中肠、马氏管、气管、丝腺、脂肪、表皮和血淋巴 8 个组织。将这 8 个组织和家蚕卵、五龄幼虫、蛹、蛾四个发育时期的样品加液氮分别充分研磨成粉末,用适量的蛋白提取裂解液 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 mM EDTA, 0.5 % NP-40,

0.5%脱氧胆酸钠,100 μg/mL PMSF, 5 μg/mL Aprotinin)冰上裂解 30 min 后,12 000 r/min,4℃离心 30 min,上清为总蛋白溶液,然后用 Bradford 法对各个时期和组织的总蛋白进行定量^[20]。取等量的各个时期及五龄虫各个组织的总蛋白进行电泳后,Western blotting 分析 BmAGO2 蛋白在家蚕中的表达谱。

1.2.5 免疫共沉淀分离 BmAGO2 蛋白

通过组织定位检测到 BmAGO2 蛋白表达量高的组织,裂解这些组织得到总蛋白溶液。分别取 1 mL 总蛋白溶液中加入 1.5 mL 的管中,加入已用 PBS 缓冲液洗涤过 50 μL protein A 磁珠(Roche),4℃缓慢摇动 45 min 后,12 000 r/min,4℃离心 15 min,取上清,加入 Kago2 自制多克隆抗体,4℃缓慢摇动 6 h 后,加入已用 PBS 缓冲液洗涤过 100 μL protein A 磁珠,4℃缓慢摇动过夜。12 000 r/min,4℃离心 2 min,取沉淀,加入 800 μL 预冷 PBS 缓冲液洗涤,12 000 r/min,4℃离心 2 min 弃上清,反复洗涤 6 次。取沉淀,加入 50 μL 2×loading buffer 进行蛋白电泳后,Western blotting 检测。

1.2.6 BmAGO2 蛋白结合的 RNA 的分离及其 cDNA 的合成

将免疫共沉淀 BmAGO2 后的 Protein A 磁珠使用 Trizol 提取 RNA。提取 RNA 后经 DNA 酶(Ambion 公司)消化后测定吸光值,将这 3 组 RNA 同时使用 Transcriptor High Fidelity cDNA synthesis Kit (Roche 公司)逆转录成 cDNA。通过 Kago2 自制多克隆抗体免疫分离的 RNA 为免疫共沉淀实验组 RNA,通过 Bmspl 自制多克隆抗体(对照抗体)免疫分离的 RNA 为免疫共沉淀对照组 RNA。

1.2.7 BmAGO2 结合 RNA 的初步分析

由于 AGO 蛋白结合 RNA 包含 miRNA 及其靶基因 mRNA,而目前家蚕中还没有已知的 miRNA 靶基因,因此采用生物信息学方法预测了 5 个家蚕 miRNA 潜在的靶基因 *Bmem4*, *Bm(spl)-like*, *Bmemc*, *Bmmy* 和 *Bmmβ2*。以这 5 个 miRNA 潜在靶基因为检测基因,通过荧光定量 PCR 方法分析所合成的 cDNA,利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法对 C_T 值进行分析,初步确定 BmAGO2 蛋白结合的 RNA 中是否存在 miRNA 靶基因 mRNA 及其相对含量。引物序列见表 1。

表 1 家蚕 miRNA 潜在靶基因 qRT-PCR 引物

基因 Gene	上游引物 Forwards primer	下游引物 Reverse primer
<i>Bmem4</i>	5'-AGATGAAACCTGTGACCTTGTGCC-3'	5'-CTTGGAGCACTGGATGTTGTTGTTC-3'
<i>Bm(spl)-like</i>	5'-ATTTTCGTTTCAGTCTGTGCCC-3'	5'-TCAACCTACCGTGGATGTG-3'
<i>Bmemc</i>	5'-CTGTTGGACAATTTGACGCTGAAG-3'	5'-CTGGTGCCGTTTGATTTCTGTGTT-3'
<i>Bmmy</i>	5'-CATCCTCCACACGAACAGCCTGAT-3'	5'-TCAGCTTTTCCAACCTTTGAGACGTTCT-3'
<i>Bmmβ2</i>	5'-CCATTGCTGGAGCGGAAACGTCG-3'	5'-TGTCCGAAGCCCGCCTGAAACTTC-3'
<i>βactinA3</i>	5'-GCGCGGCTACTCGTTCCT-3'	5'-GGATGTCCACGTCGCACTT-3'

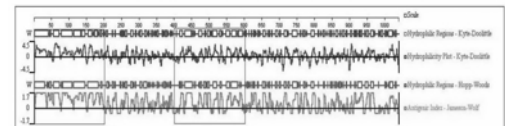
2 结 果

2.1 基因的生物信息学分析

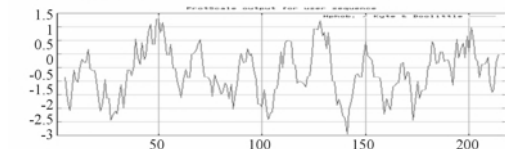
从 NCBI 中下载到 BmAGO2 全长 mRNA (GenBank 登录号为 AB206986)。Lasergene 软件分析 BmAGO2 基因的 ORF 大小为 3 117 bp,编码的蛋白含有 1 038 个氨基酸残基,预测分子量为 116.52 kDa,等电点为 9.7,为碱性蛋白;BmAGO2 蛋白的氨基酸残基在 NCBI 中比对后发现含有两个保守的功能域,分别称为 PAZ 和 PIWI 功能域(见图 1(a)),这与 AGO 蛋白家族是相同的;通过 Lasergene 软件分析获得 BmAGO2 的抗原表位区(命名为 Kago2)(见图 1(b))。软件分析结果显示 BmAGO2 蛋白氨基酸序列上 1~200 左右和 400~



(a) BmAGO2蛋白的保守域PAZ和PIWI



(b) BmAGO2蛋白序列的亲水性和抗原表位分析



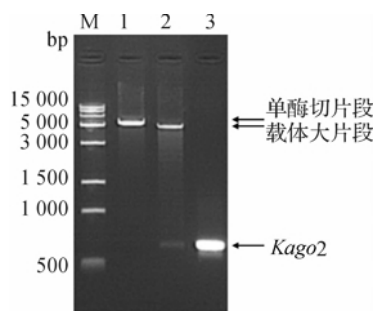
(c) Kago2蛋白的疏水性分析

图 1 BmAGO2 蛋白的生物信息学分析

600 左右这两个区域抗原表位性比较高,但 400~600 左右的区域刚好是 BmAGO2 的 PAZ 区域,所以选取该区域作为制备抗体的抗原所对应的氨基酸片段,并将该片段的氨基酸序列命名为 Kago2;同时利用 Expsasy 中的 Protscale tool 预测蛋白质的疏水性,结果显示整个 Kago2 蛋白大部分偏亲水性(见图 1(c)),这与 Lasergene 预测该区域为亲水性区域,抗原性较高的结果一致。

2.2 重组质粒的构建及鉴定

以家蚕 cDNA 为模板扩增 BmAGO2,PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后在 3 000 bp 左右显示出一条特异性条带,大小与 BmAGO2 理论值相符。以重组质粒 BL21(DE3)-pET-28a-Kago2 为模板进行 PCR 扩增,核酸电泳检测在 600 bp 附近显示出一条特异性条带,大小与 Kago2 理论值相符;并用 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行双酶切后电泳检测,分别在 600 bp 与 5 000 bp 附近出现两条与预期大小相符的条带;还用 *Eco*R I 单酶切后电泳检测在 5 000 bp 偏上有一条带,比双酶切 pET-28a 条带偏大,和预期生物信息学分析该重组质粒上只有一个 *Eco*R I 酶切位点相符(见图 2)。经 PCR、双酶切鉴定正确的重组质粒送上海生工测序结果表明该基因序列与已知序列一致,表明重组质粒构建成功。



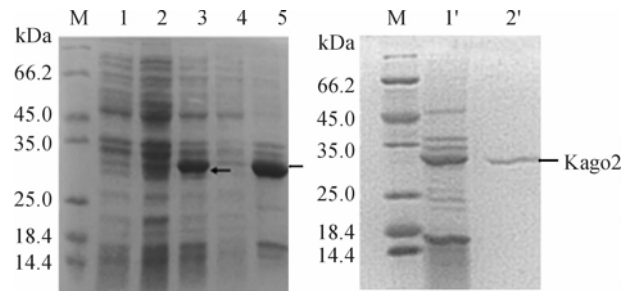
M: Trans15K DNA Marker; 1: *Eco*R I 酶切重组质粒;

2: *Bam*H I/ *Xho* I 酶切重组质粒; 3: PCR 鉴定

图 2 重组质粒 pET-28a-Kago2 的 PCR 和酶切鉴定

2.3 重组菌的诱导表达及纯化

将 BL21(DE3)-pET-28a-Kago2 重组菌经终浓度为 1 mM IPTG 诱导后,收集菌体,超声波破碎后,分别将上清和沉淀进行电泳检测。与未诱导相比,结果显示诱导后的重组菌在 30 kDa 附近有明显的蛋白表达条带。且表达产物以包涵体形式存在,通过包涵体洗涤和镍柱纯化后得到了较纯目的蛋白(见图 3)。

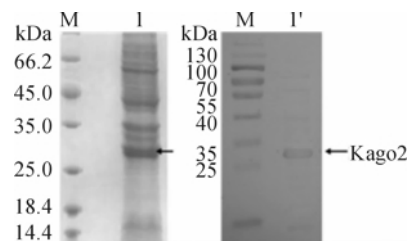


M: 低分子量蛋白 Marker; 孔道 1: 诱导空载体 pET-28a; 孔道 2: 重组菌未诱导; 孔道 3: 重组菌诱导; 孔道 4: 超声破碎后上清; 孔道 5: 超声破碎后沉淀; 孔道 1': 超声破碎后沉淀; 孔道 2': 纯化的重组蛋白

图 3 融合蛋白的表达和纯化

2.4 抗体效价测定及纯化

上述纯化的重组蛋白免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体。获得的抗血清经过 Protein A HP 凝胶柱纯化后,得到较纯的兔抗 Kago2 抗体。Western blotting 检测该抗体特异性较好(图 4);通过间接 ELISA 方法检测该抗体的效价,结果表明,自制抗体在抗原蛋白浓度为 10 μ g/mL 时抗体的效价可达 1:25 600 以上。

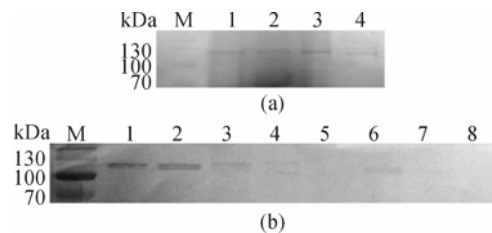


M: 低分子量蛋白 Marker; 1, 1': 诱导重组菌诱导; M': 预染蛋白 Marker

图 4 抗体特异性分析

2.5 BmAGO2 的表达谱分析

用自制 Kago2 多克隆抗体通过 Western blotting 的方法对家蚕的五龄虫、蛹、蛾、卵四个不同发育时期 BmAGO2 蛋白表达量进行分析。实验结果表明 BmAGO2 在四个发育时期都有一定的表达,而在蛹期的表达量偏低(见图 5(a))。对家蚕五



a: 家蚕发育各时期中 BmAGO2 的表达谱。M: 预染蛋白 Marker; 1: 五龄幼虫; 2: 蛹; 3: 蛾; 4: 卵。b: 家蚕五龄幼虫各组织中 BmAGO2 基因的表达谱。M: 预染蛋白 Marker; 1: 头; 2: 表皮; 3: 丝腺体; 4: 马氏管; 5: 中肠; 6: 脂肪体; 7: 气管; 8: 血淋巴

图 5 BmAGO2 的表达谱分析

龄幼虫的血淋巴、气管、脂肪、中肠、马氏管、丝腺体、表皮和头部八个组织中的 BmAGO2 蛋白表达量进行分析(图 5(b))。结果显示, BmAGO2 蛋白在家蚕五龄幼虫各组织中表达量存在较大的差异。BmAGO2 蛋白在家蚕表皮和头部中大量表达, 丝腺体、马氏管和脂肪中表达量比较低, 而血淋巴、气管和中肠中几乎没有检测到蛋白的表达。

2.6 免疫共沉淀分离 BmAGO2 蛋白及其结合的 RNA 及 cDNA 的合成

上述 2.5 实验结果得出 BmAGO2 蛋白在家蚕的头部和表皮中大量表达, 所以取家蚕的头部和表皮一起通过免疫共沉淀来分离 BmAGO2 蛋白及结合的 RNA, 免疫共沉淀后取少量 Protein A 磁珠通过 Western Blotting 检测免疫共沉淀样品(见图 6(a))。结果显示已成功的分离出 BmAGO2 蛋白。为了消除 Protein A 磁珠非特异的吸附 RNA, 所以在实验中设置了一个阴性抗体(Bmspl 蛋白抗体)作为对照组, 图 6 显示, 阴性抗体未吸附 BmAGO2 蛋白。

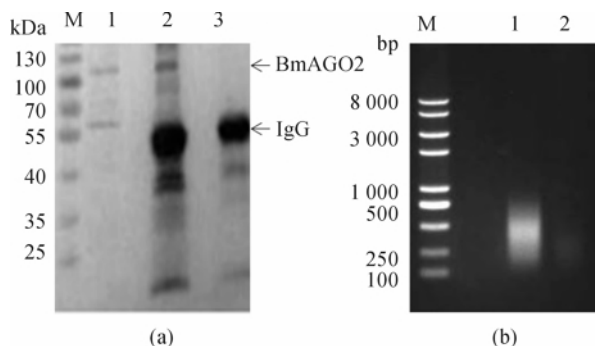


图 6 免疫沉淀分离 BmAGO2 的 Western blotting 分析及其结合 RNA 的 cDNA 电泳图

(a)免疫沉淀分离 BmAGO2 的 Western blotting 分析。M: 预染 Marker; 1: 头部和表皮未免疫的样品; 2: 头部和表皮免疫共沉淀后的样品; 3: 阴性抗体免疫后的样品。(b) BmAGO2 结合 RNA 的 cDNA 电泳图。M: Trans2K DNA Marker; 1: 免疫共沉淀实验组 cDNA; 2: 免疫共沉淀对照组 cDNA

提取 RNA 用 Nano 1000 测其浓度, 未免疫共沉淀组 RNA 结果: 浓度为 $751.7 \text{ ng}/\mu\text{L}$ (260/280 为 1.99); 免疫共沉淀实验组结果: 浓度 $118.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ (260/280 为 1.96); 免疫共沉淀对照组结果: 浓度 $25.7 \text{ ng}/\mu\text{L}$ (260/280 为 1.56)。上述获得的三组 RNA 都逆转录成 cDNA, 并进行电泳鉴定(见图 6(b))。

2.7 家蚕 BmAGO2 结合 RNA 的初步分析

为了检测 BmAGO2 结合 RNA 中是否存在 miRNA 靶基因的 mRNA 分子, 通过 qRT-PCR 方

法分析了 5 个家蚕 miRNA 潜在靶基因 Bmem4, Bm(spl)-like, Bmemc, Bmmγ, Bmmβ2 在上述合成的三组 cDNA 中的含量。利用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法对 C_T 值进行分析, 实验以未免疫组的 cDNA 为本底数据, 分别计算免疫共沉淀实验组与免疫共沉淀对照组靶基因含量相对于本底的相对量, 根据两者相除的倍数获得靶基因在免疫共沉淀实验组中的富集倍数。免疫共沉淀实验组的某个 miRNA 靶基因含量相对于本底越高, 而免疫共沉淀对照组中该基因的含量相对于本底越低, 则免疫共沉淀实验组中该靶基因所富集倍数就越高, 那么该基因越有可能为 BmAGO2 特异的结合 RNA, 为家蚕 miRNA 的靶基因。

由于没有已知的家蚕 miRNA 靶基因, 笔者选取 5 个家蚕 miRNA 潜在靶基因 Bmem4, Bm(spl)-like, Bmemc, Bmmγ, Bmmβ2 为测试基因, 通过 qRT-PCR 后, 利用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法对 C_T 值进行分析后。与免疫共沉淀对照组 RNA 相比, Bmem4, Bm(spl)-like, Bmemc, Bmmγ, Bmmβ2 基因在 BmAGO2 结合 RNA 中的含量分别富集了 3.93、1.31、2.4、1.31、0.97 倍(见图 7)。如果富集倍数超过 1.5 倍, 就认为该基因很有可能是家蚕 miRNA 的靶基因。所以根据表中数据显示 Bmem4 和 Bmemc 两个基因很有可能是家蚕 miRNA 的靶基因, 目前正在进行进一步实验验证。

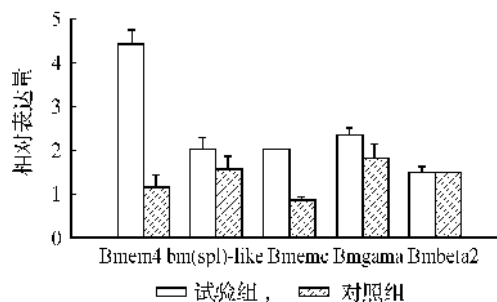


图 7 通过 qRT-PCR 分析 BmAGO2 结合的 RNA

3 讨论

RNA 诱导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)是 miRNA/RNAi 行使功能的主要组分, 是一种包含多种核蛋白/RNA 复合体, 其中 Argonaute(AGO)蛋白是 RISC 的核心元件, 其能够结合 miRNA 并具有剪切靶基因的功能^[6]。利用 AGO 蛋白抗体通过免疫共沉淀的方法来分离其结合的 RNA 是目前规模化分离鉴定 miRNA 靶基因的主要方法。

本实验使用原核表达系统表达家蚕 BmAGO2

蛋白中抗原表位高的片段(Kago2),制备多克隆抗体。分析了家蚕发育的各个时期和家蚕五龄虫各个组织 BmAGO2 蛋白的表达谱,结果显示,在五龄幼虫各组织中 BmAGO2 蛋白的表达差异较明显,BmAGO2 蛋白在家蚕头部和表皮中大量表达。由于 AGO 蛋白是 RISC 的核心元件,是 miRNA 功能通路的关键组分^[9],推测在家蚕的头部和表皮中可能存在大量的 miRNA 基因调控。

进一步采用免疫共沉淀方法分离 BmAGO2 结合 RNA,为了鉴定上述分离的 AGO 蛋白结合 RNA 中是否存在 miRNA 靶基因 mRNA,通过 qRT-PCR 方法分析其 cDNA 中 miRNA 靶基因的相对含量。由于目前家蚕中没有已知的 miRNA 靶基因,笔者采用生物信息学方法预测了 5 个家蚕 miRNA 潜在的靶基因 Bmem4, *Bm(spl)-like*、*Bmemc*, *Bmmγ* 和 *Bmmβ2*。这 5 个基因为家蚕 notch 途径靶基因 E(spl)-C 家族的基因。在果蝇中,E(spl)-C 家族基因存在 Brd box(GUCUUC)、GY box(AGCUUUA)和 K box(cUGUGAUa)保守域,果蝇 miRNA 正是通过结合这些保守域来对这些基因进行调控^[21]。根据 2.7 结果,通过生物信息学方法分析发现 Bmem4 (GenBank 登录号为 FJ436408)和 *Bmemc* (GenBank 登录号为 DQ311169)两个基因 mRNA 的 3'UTR 区同样存在结合 miRNA 的这 3 个保守 box 位点^[22](见图 8)。

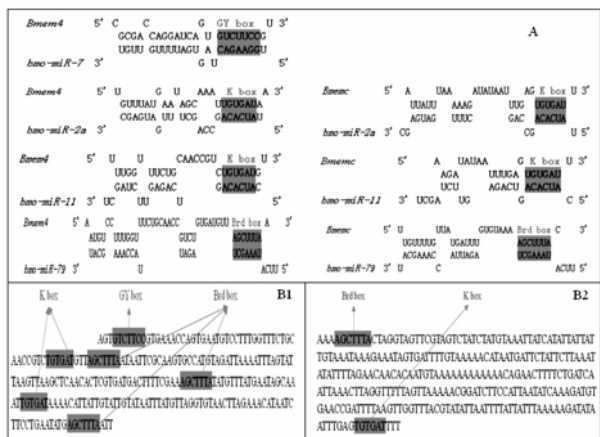


图 8 Bmem4 和 *Bmemc* 基因保守的 miRNA 结合 box 分析 A:结合位点示意图;B1:Bmem4 基因 3'UTR 区的 miRNA 结合位点;B2:*Bmemc* 基因 3'UTR 区的 miRNA 结合位点

从图 8 可以看出,这 3 个 box 分别和家蚕 miRNA 基因 *bmo-mir-7*, *bmo-mir-11*, *bmo-mir-2a* 和 *bmo-mir-79* 结合。另外,通过 miRNA 结合位点分析还发现这两个基因 3'UTR 区同时存在多个 *bmo-miR-2733* 家族基因的结合位点(见图 9)。



图 9 Bmem4 和 *Bmemc* 基因中 *bmo-miR-2733* 家族基因结合位点分析

(a) *Bmem4* 3'UTR 区的 miRNA 结合位点; (b) *Bmemc* 3'UTR 区的 miRNA 结合位点

由上述分析可知,家蚕中 Bmem4 和 *Bmemc* 基因可能为 miRNA 调控靶基因,目前正在进行实验验证。目前为止,还没有家蚕 miRNA 靶基因鉴定的相关工作,BmAGO2 结合 RNA 的有效分离将为家蚕 miRNA 靶基因的规模化鉴定提供有效实验参考。

4 结论

选取 BmAGO2 蛋白氨基酸序列上 400 aa~600

aa 之间的区域作为制备抗体的抗原所对应的氨基酸片段,并将该片段的氨基酸序列命名为 Kago2。成功构建了重组质粒 BL21 (DE3)-pET-28a-Kago2,利用大肠杆菌原核表系统表达了 Kago2 蛋白。用纯化后的 Kago2 蛋白免疫新西兰大白兔制备了多克隆抗体,抗体效价可达到 1:25 600 以上。对家蚕 BmAGO2 蛋白表达谱分析表明,BmAGO2 在卵、五龄虫、蛹、蛾四个时期都有一定量的表达,而在蛹期的表达量偏低;BmAGO2 在家蚕五龄幼虫各组织中表达量存在较大的差异,表皮和头部大量表达,丝腺体、马氏管和脂肪中表达量比较低,而血淋巴、气管和中肠中几乎没有检测到蛋白的表达。利用多克隆抗体通过免疫共沉淀的方法成功地分离出家蚕的头部和表皮 BmAGO2 蛋白。提取了与 BmAGO2 蛋白结合的 RNA,其浓度为 118.5 ng/ μ L (260/280 为 1.96)。利用 qRT-PCR 方法分析表明,家蚕 miRNA 潜在靶基因 Bmem4, *Bm(spl)-like*, *Bmemc*, *Bmm γ* , Bmm β 2 在 BmAGO2 结合 RNA 中的含量分别富集了 3.93、1.31、2.4、1.31、0.97 倍。

参考文献:

- [1] Bartel B, Bartel D P. MicroRNAs: at the root of plant development? [J]. *Plant Physiol*, 2003, 132(2): 709-717.
- [2] 杨燕萍, 郭素霞, 陈 晶, 等. 编码日本血吸虫 Argonaute 蛋白全长 cDNA 克隆, 表达及初步鉴定[J]. *中国人兽共患病学报*, 2010(9): 830-834.
- [3] Höck J, Meister G. The Argonaute protein family[J]. *Genome Biol*, 2008, 9(2): 210.
- [4] Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA[J]. *Nature*, 2004, 431(7006): 343-349.
- [5] Filipowicz W, Jaskiewicz L, Kolb F A, et al. Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2005, 15(3): 331-341.
- [6] Kandeel M, Kitade Y. Computational analysis of siRNA recognition by the Ago2 PAZ domain and identification of the determinants of RNA-induced gene silencing[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57140.
- [7] Nagata Y, Lee J M, Mon H, et al. RNAi suppression of beta-N-acetylglucosaminidase (BmFDL) for complex-type N-linked glycan synthesis in cultured silkworm cells [J]. *Biotechnol Lett*, 2013, 35(7): 1009-1016.
- [8] Hendrickson D G, Hogan D J, Herschlag D, et al. Systematic identification of mRNAs recruited to argonaute 2 by specific microRNAs and corresponding changes in transcript abundance [J]. *PLoS One*, 2008, 3(5): e2126.
- [9] Shukla G C, Singh J, Barik S. MicroRNAs: processing, maturation, target recognition and regulatory functions[J]. *Mol Cell Pharmacol*, 2011, 3(3): 83-92.
- [10] 李海芳, 浦 永, 汤石明, 等. 人 Argonaute2 蛋白多克隆抗体制备及初步应用[J]. *中国免疫学杂志*, 2010, 26(003): 241-244.
- [11] Wang W X, Wilfred B R, Hu Y, et al. Anti-Argonaute RIP-Chip shows that miRNA transfections alter global patterns of mRNA recruitment to microribonucleoprotein complexes[J]. *RNA*, 2010, 16(2): 394-404.
- [12] Beitzinger M, Peters L, Zhu J Y, et al. Identification of human microRNA targets from isolated argonaute protein complexes[J]. *RNA Biology*, 2007, 4(2): 76.
- [13] Easow G, Teleman A A, Cohen S M. Isolation of microRNA targets by miRNP immunopurification [J]. *Rna*, 2007, 13(8): 1198-1204.
- [14] Karginov F V, Conaco C, Xuan Z, et al. A biochemical approach to identifying microRNA targets[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(49): 19291-19296.
- [15] Landthaler M, Gaidatzis D, Rothballer A, et al. Molecular characterization of human Argonaute-containing ribonucleoprotein complexes and their bound target mRNAs[J]. *RNA*, 2008, 14(12): 2580-2596.
- [16] Tan L P, Seinen E, Duns G, et al. A high throughput experimental approach to identify miRNA targets in human cells [J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(20): e137.
- [17] Beitzinger M, Meister G. Experimental identification of microRNA targets by immunoprecipitation of Argonaute protein complexes[J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 732: 153-167.
- [18] Beitzinger M, Peters L, Zhu J Y, et al. Identification of human microRNA targets from isolated argonaute protein complexes[J]. *RNA Biol*, 2007, 4(2): 76-84.
- [19] Murad H, Ali B, Makeya R, et al. Prokaryotic over-expression of TEV-rhGH and characterization of its polyclonal antibody[J/OL]. *Gene*, 2014. www.elsevier.com/locate/gene.
- [20] Aminian M, Nabatchian F, Vaisi-Raygani A, et al. Mechanism of Coomassie Brilliant Blue G-250 binding to cetyltrimethylammonium bromide: an interference with the Bradford assay[J]. *Anal Biochem*, 2013, 434(2): 287-291.
- [21] Lai E C, Tam B, Rubin G M. Pervasive regulation of

Drosophila Notch target genes by GY-box-, Brd-box-, and K-box-class microRNAs[J]. Genes & Development, 2005, 19(9): 1067-1080.

[22] Cao B, Ji T, Zhou B, et al. Predicting the target genes of microRNA based on microarray data[J]. Genet Mol Res, 2013, 12(4): 6059-6666.

Preliminary Study on Expression Analysis of Silkworm Argonaute2 and Its Binding RNA

ZHANG Yu^{a,b}, HONG Ye-ting^{a,b}, SHENG Qing^{a,b}, CHEN Jian^{a,b}, YU Wei^{a,b},

WANG Dan^{a,b}, WU Xiang-fu^{a,b}, ZHANG Yao-zhou^{a,b}, NIE Zuo-ming^{a,b}

(a. School of Life Science, b. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Silkworm Bioreactor and Biomedicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: This study extends to complete ORF sequence of silkworm BmAGO2 gene from silkworm cDNA library, obtains antigen epitope area (named as Kago2) of BmAGO2 through Lasergene software analysis, establishes an expression vector containing Kago2 and transforms escherichia coli induction expression. New Zealand white rabbits are immunized with fusion protein subject to nickel column affinity chromatography and purification and polyclonal antibody is prepared. ELISA and Western blotting test that the valence of antiserum can be over 1 : 25, 600 and it has a good antibody specificity. The result of expression profiling shows that BmAGO2 protein is expressed in egg stage, pupal period, moth period and five-instar larval phase of silkworm, but its expression quantity is lower in pupal period. The expression of BmAGO2 has significant difference in each tissue of five-instar larvae. BmAGO2 protein is greatly expressed in head and epidermis and slightly expressed in silk gland, malpighian tubule and fat. The expression of this protein is not detected in hemolymph, weasand and midgut. In combination with the result of BmAGO2 expression profiling, this study further uses its antibody to separate BmAGO2 protein and binding RNA from silkworm head and epidermis with high expression quantity of BmAGO2 protein with the method of co-immunoprecipitation and make it into cDNA through reverse transcription. According to the comparison of BmAGO2 binding RNA obtained through fluorescent quantitative PCR analysis with silkworm miRNA potential target gene Bmem4, Bm(spl)-like, Bmemc, Bmmy, Bm β 2 as test genes and RNA in the control group, contents of Bmem4, Bm(spl)-like, Bmemc, Bmmy, Bm β 2 genes in BmAGO2 binding RNA are enriched respectively by 3.93, 1.31, 2.4, 1.31 and 0.97 times. miRNA target site analysis shows that Bmem4 and Bmemc have multiple miRNA binding sites and they are very likely to be target genes of miRNA. There is no effective high throughput identification method of silkworm miRNA target gene currently. This experiment provides a reliable experimental approach for high throughput screening of silkworm miRNA target gene.

Key words: BmAGO2; expression profiling; binding RNA; co-immunoprecipitation; miRNA target gene

(责任编辑: 许惠儿)