

山羊肌肉组织 microRNA Solexa 测序与生物信息学分析

凌英会^{1,2}, 张晓东^{1,2}, 王丽娟^{1,2}, 殷捷^{1,2}, 向浩^{1,2}, 李运生^{1,2}, 张运海^{1,2},
张子军^{1,2}, 丁建平^{1,2*}, 章孝荣^{1,2*}

(1. 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036; 2. 安徽省地方畜禽遗传资源保护和生物育种重点实验室, 合肥 230036)

摘要: 本研究旨在挖掘山羊肌肉组织 miRNA, 获取山羊肌肉组织 miRNA 表达谱并分析其生物学特征, 为进一步研究特定 miRNA 参与山羊肌肉细胞的增殖与分化等生长发育机制奠定理论基础。从山羊肌肉组织中提取总 RNA, 分离、构建小片段 RNA 文库, 利用 Solexa 方法进行测序并进行生物信息学分析, 最后利用 q-PCR 技术验证 miRNA 在山羊肌肉组织中的表达情况。共鉴定出 517 个物种间保守的和 2 个山羊基因组特有的 miRNA。其中 306 个表达量在 100 以上。随机选择 8 个 miRNA, 利用 q-PCR 验证其在山羊肌肉组织中的表达情况, 结果与测序结果一致。同时 miRNA 靶基因预测和功能分析表明, 很多 miRNA 可能影响一些与动物肌肉发育相关的细胞信号通路。测序成功获取了山羊肌肉组织 miRNA 序列及其表达谱, 山羊肌肉组织 miRNA 表达丰富且表达量各异。本研究也为进一步研究 miRNA 调控哺乳动物肌肉发育奠定了理论基础。

关键词: 山羊; 肌肉; microRNA; 测序; 特征

中图分类号: S827.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)03-0481-07

Solexa Sequencing and Bioinformatics Analysis on MicroRNA from the Goat Muscle

LING Ying-hui^{1,2}, ZHANG Xiao-dong^{1,2}, WANG Li-juan^{1,2}, YIN Jie^{1,2}, XIANG Hao^{1,2},
LI Yun-sheng^{1,2}, ZHANG Yun-hai^{1,2}, ZHANG Zi-jun^{1,2}, DING Jian-ping^{1,2*}, ZHANG Xiao-rong^{1,2*}
(1. College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2. Local Animal Genetic Resources Conservation and Biobreeding Laboratory of Anhui Province, Hefei 230036, China)

Abstract: Characterization of microRNA expression in goat muscle was studied, with the purposes of providing basic information for further studies of goat growth and development activities such as goat muscle cell proliferation and differentiation. The small RNAs isolated from total RNA of goat muscle were sequenced by Solexa and then bioinformatics analysis was performed. Meanwhile, the expression of selected miRNA was validated by q-PCR. Based on Solexa sequencing and bioinformatics analysis, 517 muscle miRNAs, which are conservative on evolution of mammals (sheep, bovine, swine, horse, dog), and 2 goat genome-specific miRNA were identified. Among them, 306 exceeded 100 in the expression levels. The expression of 8 selected miRNA in muscle tissues obtained by q-PCR was agreement with Solexa sequencing results. MiRNA target gene prediction and functional analysis showed that many miRNAs among them may affect

收稿日期: 2012-09-28

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2011AA100307); 安徽省技术创新工程试点省专项(11Z0101095); 安徽省科技计划项目(11010302108)

作者简介: 凌英会(1981-), 男, 安徽安庆人, 博士, 主要从事动物遗传育种方面研究, E-mail: caaslyh@163.com

* 通信作者: 章孝荣, 教授, 博士生导师, 主要从事动物遗传育种与繁殖方面研究, Tel: 0551-65785928, E-mail: zxr@ahau.edu.cn; 丁建平, 副教授, 硕士生导师, 主要从事动物生殖调控方面研究, E-mail: dingjianping@ahau.edu.cn

cell signaling pathways and animal muscle development. Succeed in construction of expression profiling of miRNA which are abundant and differentially expressed in goat muscle tissues. This study provides important information on the role of miRNA regulation in muscle growth and development.

Key words: goat; muscle; microRNA; sequencing; characteristic

MicroRNA (miRNA) 是一类新发现的长约 22 nt 非编码的小分子 RNA。miRNA 通过与靶标特异性的碱基互补配对,引起靶 mRNA 降解、稳定性下降或者抑制其翻译,从转录后水平调节基因的表达,从而参与动物的生殖、生长、发育等多种生命活动^[1-3]。研究山羊肌肉组织 miRNA 表达谱和特征对于进一步揭示其在山羊肌肉细胞增殖、分化等生长发育过程中的作用及机理具有重要意义。

哺乳动物骨骼肌的发育过程中,多种调节因子,包括转录因子和细胞信号分子在肌肉细胞增殖和分化过程中起关键作用^[3]。近来的研究表明,miRNA 通过序列、结构、丰度和转录方式的多样性,在基因表达调控领域介导了一个全新层次上的基因表达调控方式^[4]。由基因组中非蛋白质编码区或内含子编码的 miRNA 参与了骨骼肌的增殖与分化调控过程^[5]。miRNA 能调节平滑肌细胞(SMCS)的表型在增殖和分化之间发生转变,如 miR-25 能调节平滑肌细胞的增殖^[6];而抑制 miR-26a 能加速平滑肌细胞的分化^[7]。miR-206 和 miR-486 则能通过直接与 Pax7 基因 3'-UTR 结合来下调 Pax7 的表达,从而调控肌细胞的合成,影响肌肉发育^[8]。另外,T. G. McDanel 等分离猪骨骼肌组织中的 miRNA,并分析了猪骨骼肌 miRNA 在不同时期和不同组织的表达情况,为进一步研究肌肉 miRNA 调控作用提供了基础^[9]。除此之外,miR-1、miR-26、miR-27、miR-133、miR-206 和 miR-222 等 miRNA 在山羊、奶牛、鸡等家养动物的骨骼肌发育过程中差异性表达^[10-12],暗示这些小 RNA 对动物的骨骼肌发育可能具有重要的调控作用。这些研究成果都充分体现了 miRNA 对肌肉发育有重要的调控作用。

目前,miRBase 18.0 数据库中尚未收录山羊 miRNA 信息,而关于山羊肌肉组织特异性 miRNA 测序与表达谱情况的研究亦未见报道。本研究拟通过对山羊肌肉组织小 RNA 进行 Solexa 测序,挖掘山羊肌肉组织 miRNA,并进行 q-PCR 试验验证和生物信息学分析,为研究 miRNA 在山羊肌肉细胞增殖、分化等生长发育过程中作用机理提供生物学

基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验动物为出生日期相同的 3 只安徽白山羊,采自合肥博大牧业科技开发有限责任公司。在相同的饲养管理条件下饲养至 6 月龄屠宰,宰后迅速采集背最长肌样品,装入无 RNase 的离心管中,立即置于液氮中保存,用于总 RNA 的提取。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取 按照 Trizol (Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA)一步法提取山羊肌肉总 RNA,柱纯化后用 Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Nechnologies, Wilmington, DE)分析浓度,用 Agilent BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA)进行质量检测。总 RNA 于 -70 °C 冰箱保存备用。

1.2.2 山羊肌肉 Solexa 测序 利用 15% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳技术 (PAGE) 从总 RNA 中分离小片段 15~30 nt RNA,纯化后对分离的小片段 RNA 连接 3' 和 5' 接头。再运用 SuperScript II 反转录酶将连接有 5' 和 3' 接头的 RNA 进行反转录,合成 cDNA。并进行 PCR 扩增,扩增程序:98 °C 预变性 30 s;98 °C 变性 10 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 15 s,14 个循环;72 °C 延伸 8 min;4 °C 保存。扩增后的 cDNA 经纯化检测合格后,送深圳华大基因科技有限公司进行 Solexa 测序。

1.2.3 肌肉 miRNA 获取 对上述测序获得的序列数据进行去除污染、去除接头的处理,然后进行序列统计,获得有效序列用作后续分析。将有效序列比对到相应的生物信息数据库 (GenBank、Repeat sequence、Rfam 数据库),去除 rRNA、tRNA、snoRNA、snRNA 等非编码小 RNAs;然后将剩余序列比对到 miRBase18.0 中绵羊、牛、猪、马、狗 5 个哺乳动物已知 miRNA 的成熟序列或前体序列,从而得到在山羊及这 5 个物种间保守的 miRNA;最后将剩余序列比对到山羊 EST 数据库,通过截取与小

RNA 匹配的 50~70 bp 的 EST 序列,利用 Mireap 软件预测山羊特有的 miRNA。

1.2.4 物种间保守的 miRNAs 鉴定 由于 miRBase18.0 目前还没有收录山羊的 miRNAs,所以首先将有效序列比对到基因组中(<http://soap.genomics.org.cn>),GenBank(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>),Rfam 数据库(<http://www.mirbase.org>),有效去除 rRNA、tRNA、snoRNA、snRNA 和 repeat 等非编码小 RNAs,然后将剩余序列比对到 miRBase18.0 中绵羊、牛、猪、马、狗 5 个哺乳动物已知 miRNAs 的成熟序列或前体序列,从而得到在山羊、绵羊、牛、猪、马、狗 6 个物种间保守的 miRNAs。

1.2.5 山羊特有 miRNA 预测 由于目前山羊的全基因组序列还没有公布,所以将鉴定为保守 miRNAs 以外的序列比对到 GenBank 上的山羊 EST 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuc-est?term=capra%20hircus>),通过截取与小 RNA 匹配的 50~70 bp 的山羊 EST 序列,利用商业软件

Mireap (华大, <http://sourceforge.net/projects/mireap/>)探寻其发夹结构和 Dicer 酶切位点信息,预测山羊特有的 miRNAs。预测标准:初步分析序列长度为 15~26 nt;本文筛选 miRNA 参考序列长度 20~24 nt;Drosha/Dicer 酶切位点最小深度为 3;参考 miRNAs 最大拷贝数为 20;最大允许的 miRNA 前体自由能为 $-18 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$;miRNA 与 miRNA* 之间最大空间为 35;miRNA 与 miRNA* 最小碱基对为 14;miRNA 与 miRNA* 间最大隆起为 4;miRNA/miRNA* 最大不对称为 5;miRNA 前体侧翼序列长度为 10。

1.2.6 实时定量 PCR 验证(q-PCR) 在上述分析获得序列结果中随机选取 8 个 miRNA,以 U6 snRNA 作为内参基因,采用 TaqMan miRNA Assays 定量试剂盒,检测选取 miRNA 在山羊肌肉组织中的表达量,试验步骤参照试剂盒说明书进行,相对表达量结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行计算分析^[13]。miRNA 及内参基因探针序列见表 1。

表 1 8 个选取 miRNA 定量检测的引物序列

Table 1 The primer sequences of 8 miRNA for q-PCR

内参基因和 miRNA Control gene and miRNA	TaqMan 探针序列(5'-3') TaqMan probe sequences	测序表达量 Expression of Solexa sequencing
U6 snRNA	CAAGGATGACACGCAAATTCG	
miR-26a	TTCAAGTAATCCAGGATAGGCT	71 236
miR-206	TGGAATGTAAGGAAGTGTGTGG	598 768
miR-27a	TTCACAGTGGCTAAGTTCCGC	2 763
miR-383	AGATCAGAAGGTGATTGTGGCT	10
miR-320	AAAAGCTGGGTTGAGAGGGCGA	12 560
miR-187	TCGTGTCTTGTGTTGCAGCCGGA	82
miR-27b *	AGAGCTTAGCTGATTGGTGAAC	3 255
JR-m0002	GCAGAAGCCTGGATGGTGTCA	268

1.2.7 miRNAs 靶基因预测及功能分析 由于目前山羊全基因组序列尚未公布,所以将 miRNAs 比对到 GenBank 上的山羊 unigene 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene/?term=capra%20hircus>),利用 RNAhybrid 软件(<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>)预测 miRNAs 在山羊基因组中所有的潜在靶基因位点,然后对所有靶基因进行 KEGG 功能通路分析(<http://www.genome.jp/kegg>),探索 miRNAs 可能调控的靶基因及参与的细胞信号通路。靶基因预测

标准如下:小 RNA 与靶标之间不超过 4 个碱基的错配(G-U 错配按 0.5 个碱基计算);在 miRNA 与靶标配对中相邻的错配碱基不超过 2 个;在 miRNA 与靶标配对 2~12 碱基位置没有相邻的错配(5' of miRNA);在 miRNA 与靶标配对 10~11 碱基位置没有错配;在 miRNA 与靶标配对 1~12 碱基中错配碱基不超过 2.5 (5' of miRNA);miRNA 与靶标配对最小自由能(MFE) $\geq 75\%$ 。

2 结果

2.1 RNA 提取结果

用 mirVana™ miRNA Isolation Kit (Ambion) 提取的小 RNA 质量鉴定是由去除小片段 RNA 后得到的 RNA 副产品用琼脂糖凝胶电泳检测, 1% 琼脂糖凝胶电泳结果, 与 Trizol 法提取的肌肉组织总 RNA 相比可以看出在 5S 位置几乎看不到条带 (图略)。18S 和 28S 条带清晰, 说明 RNA 完整无降解。也预示着提取的小 RNA 质量良好。

2.2 Solexa 测序结果及数据处理

测序获得 8.91 million (M) 的 Total reads 原始的数据后, 对其进行去接头, 去低质量 reads, 去污染等处理, 得到 8.60 million (M) 干净的序列, 其中所得数据质量如表 2 所示。然后统计小 RNA (sRNA) 的种类及数量, 并对小 RNA 做长度分布统计, 通过长度分布的峰能判断小 RNA 的种类, 如 miRNA 集中在 21 或 22 nt, siRNA 集中在 24 nt, 大部分序列长度位于 21~23 nt (图 1), 其中长度为 22 nt 的序列占 50.23%。通过 SOAP 将 sRNA 定位到基因组, 分析 sRNA 在基因组上的表达和分布情况。其中测序数据中 Unique sRNAs 比对到基因中的有 51 765 (12.86%), 总 Total sRNAs 比对到基因组上的有 659 596, 占 8.16%。

表 2 小 RNA 测序所得质量情况

Table 2 Summary of data cleaning of tags produced by small RNA sequencing

片段类型 Type	数量 Counts	百分比/% Percent
Total_reads	8 912 605	
High_quality	8 606 758	100.00
3'adapter_null	70 575	0.82
Insert_null	10 931	1.27
5'adapter_contaminants	18 935	0.22
Smaller_than_15nt	327 543	3.81
polyA	0	0.00
Clean_reads	8 079 677	93.88

2.3 已知 miRNA 比对与表达谱分析

由于 miRBase18.0 目前还没有收录山羊的 miRNA, 所以有效去除 rRNA、tRNA、snoRNA、snRNA 和 repeat 等非编码小 RNAs 后, 将剩余序列比对到 miRBase18.0 中绵羊、牛、猪、马、狗 5 个

哺乳动物已知 miRNA 的成熟序列或前体序列 (默认 G-U 配对, 允许 1~2 个碱基错配), 从而得到山羊基因组中存在的在这 5 个物种间保守的 miRNA。共比对上 517 个 miRNA, 其中表达量在 100 以上的有 306 个。表达量前 10 位的 miRNA 如表 3 所示, 其表达量都在 100 000 以上。

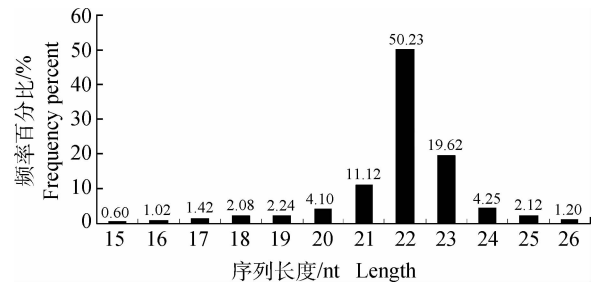


图 1 所有测序所得 RNA 长度分布状况

Fig. 1 Length distribution of tags produced by small RNA sequencing

2.4 山羊特有 miRNA 预测与表达信息

miRNA 前体的标志性发夹结构, 能够用来预测新的 miRNA。通过对截取一定长度 sRNA 比对的基因组序列, 探寻其二级结构及 Dicer 酶切位点信息、能量等特征, 采用 miRNA 预测软件 Mireap (<http://sourceforge.net/projects/mireap/>), 由于目前山羊的全基因组序列还没有公布, 所以将鉴定为保守 miRNA 以外的序列比对到 GenBank 上的山羊 EST 数据库, 通过截取与小 RNA 匹配的 50~70 bp 的山羊 EST 序列, 利用上述软件预测山羊特有的 miRNA。表 4 中显示预测出的新 miRNA 的表达谱信息。由于目前山羊的全基因组序列还没有公布, 所以将鉴定为保守 miRNAs 以外的序列比对到 GenBank 上的山羊 EST 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest?term=capra%20hircus>), 通过截取与小 RNA 匹配的 50~70 bp 的山羊 EST 序列, 利用商业软件 Mireap (华大, <http://sourceforge.net/projects/mireap/>) 探寻其发夹结构和 Dicer 酶切位点信息, 预测山羊特有的 miRNAs。预测标准: 初步分析序列长度为 15~26 nt; 本研究筛选 miRNA 参考序列长度 20~24 nt; Drosha/Dicer 酶切位点最小深度为 3; 参考 miRNAs 最大拷贝数为 20; 最大允许的 miRNA 前体自由能为 $-18 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$; miRNA 与 miRNA* 之间最大空间为 35; miRNA 与 miRNA* 最小碱基对为 14; miRNA 与 miRNA* 间最大隆起为 4; miRNA/

miRNA* 最大不对称为 5; miRNA 前体侧翼序列长度为 10。表 4 中显示预测出的新 miRNA 的表达谱

信息。并预测其发卡结构,如图 2 所示。

表 3 表 3 山羊测序中已知 miRNA 表达量(前 10 的表达谱)

Table 3 Summary of known miRNA in goat sample (Expression level of the top 10)

miRNA 家族 miRNA family	表达量 Expression level	序列 Sequence (5'-3')
miR-133c	1 521 536	TTGGTCCCCTTCAACCAGCTG
miR-133a	1 507 842	TTGGTCCCCTTCAACCAGCTGT
miR-133b	1 462 525	TTTGGTCCCCTTCAACCAGCTGT
miR-378	1 187 206	ACTGGACTTGAGTCAGAAGGC
miR-1	1 123 562	TGGAATGTAAAGAAGTATGTAT
miR-206	598 768	TGGAATGTAAGGAAGTGTGTGG
miR-143	367 426	TGAGATGAAGCACTGTAGCTCT
miR-16a	220 650	TAGCAGCACGTAAATATTGGAG
miR-16b	216 156	TAGCAGCACGTAAATATTGGA
let-7a	125 026	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT

表 4 山羊肌肉新 microRNA

Table 4 Novel miRNA prediction in muscles of goat

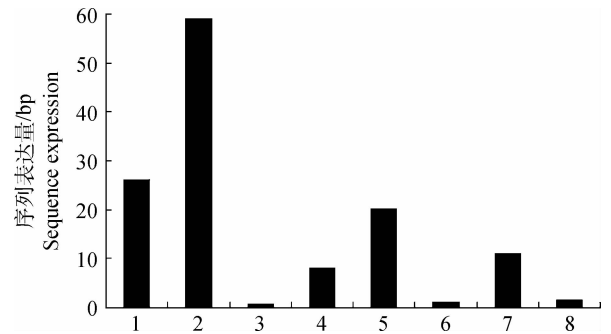
样品 Samples	表达量 Expression level	位置 Location	序列 Sequence (5'-3')
JR-m001	17	5'	CTTCTCCTCACTCCGTCCAGT
JR-m002	268	3'	GCAGAAGCCTGGATGGTGTCA



图 2 山羊肌肉中 2 个新 microRNA 发卡结构
Fig. 2 Two new microRNA haipin structure in goat muscle

2.5 q-PCR 验证结果

使用 q-PCR 检测了 8 个随机选择的山羊肌肉 miRNA 的表达水平。从图 3 的结果显示,8 个 miRNA 的山羊肌肉中都有表达,且表达趋势与 Solexa 测序的结果(表 1)一致。



1. miR-26a; 2. miR-206; 3. miR-383; 4. miR-27a; 5. miR-320; 6. miR-187; 7. miR-27b*; 8. miR-0002

图 3 山羊肌肉中 8 个 miRNA 的相对表达量

Fig. 3 The relative expressions of eight randomly selected miRNA from goat muscle

2.6 miRNA 靶基因预测及功能分析

将 miRNA 比对到 GenBank 上的山羊 unigene 数据库,利用 RNAhybrid 软件预测 miRNA 在山羊基因组中潜在靶基因位点,然后对所有靶基因进行 KEGG 功能通路分析,探索 miRNA 可能调控的靶基因及参与的细胞信号通路^[14]。对 Mireap 预测出的 miRNA 进行靶基因预测,得到可预测出靶基因

的 miRNA 数量以及这些 miRNA 的预测靶基因数量。共预测出 8 262 个 miRNA 靶基因位点。其中参与 Wnt signaling pathway 信号通路的靶基因就有 288 个。除此之外,还有多个表达量较高的 miRNA 参与了生长发育相关的信号通路(数据略)。

3 讨论

3.1 miRNA 参与肌肉生长发育调控

近年来,生长发育相关基因组学研究的趋势之一是逐渐从基因结构和功能分析转到基因表达调控机理上。而 miRNA 的调控功能是基因表达调控的重要方面,其在转录后水平上介导了一个全新层次的基因表达调控方式。miRNA 通过调控一些转录因子及一些信号传导因子来调节肌肉形成过程中细胞增殖、分化,与肌肉发育密切相关^[9, 15]。所以除了研究蛋白编码基因外,还须研究肌源 miRNA 的调控作用才有可能阐明骨骼肌生长发育分子调控机制的全部内容。

本研究运用 Solexa 技术对安徽白山羊肌肉组织中的小 RNA 进行测序,获取山羊肌肉 miRNA 表达谱。结果发现山羊肌肉组织小 RNA 文库中大部分都是保守 miRNA。同时,在山羊 unigene 数据库中对这些 miRNA 进行靶基因预测和功能分析,结果发现一些保守的 miRNA 参与一些与动物肌肉生长发育相关的细胞信号通路。

3.2 分析数据库选择与分析

由于目前山羊全基因组序列尚未公布,miRBase v18.0 也未收录山羊 miRNA 信息^[16],因此只能利用山羊近缘物种(哺乳动物)的 miRNA 结合山羊 EST 序列与 unigene 信息进行山羊 miRNA 相关研究。

本研究共发现了 517 个物种间保守的 miRNA,这些 miRNA 均来自同源比对,很大程度地依赖于 miRBase v18.0 中的数据数量与质量。但从理论上对候选 miRNA 都需要进行 q-PCR 验证^[17]。本研究随机选取了 8 个 miRNA 进行 q-PCR 定量验证,所选 miRNA 都有表达,进一步证实测序分析结果的可靠性。同时,本研究利用山羊 EST 序列信息仅预测出山羊特有的 2 个 miRNA,造成这种结果的原因是由于 GenBank 中山羊的 EST 序列信息同样匮乏,这点与 Y. Wei 等^[18]和 Y. Fu 等^[19]的研究一致。

3.3 肌肉 miRNA 表达谱研究

现阶段关于猪、牛、绵羊等家养动物肌肉 miRNA 的研究较多^[9, 11, 20]。研究发现大量 miRNA 普

遍与它们的宿主基因共表达,且 miRNA 的表达具有组织特异性^[21]。T. G. McDanel 等^[9]分离猪骨骼肌组织中的 miRNA,结果显示 miR-206 等多个 miRNA 在骨骼肌中高表达。已有研究显示山羊中乳腺和皮肤中存在大量的 miRNA,而有关山羊肌肉 miRNA 的研究鲜有报道^[22-23]。

动物机体中,miRNA 一般通过作用于靶 mRNA 的特定位点实现其对靶基因表达的转录后调控,抑制靶基因表达或降解靶 mRNA^[24],所以本研究中山羊肌肉中高表达的 miRNA 可能参与肌肉细胞增殖与分化相关的一些靶基因的表达,从而影响山羊的生长发育。在本试验测序获得山羊肌肉 mRNA 表达谱表达量前 10 的 miRNA 中,miR-133c、miR-133a、miR-133b、miR-1、miR-378、miR-206、miR-143 和 let-7a 这些 miRNA 是在猪和小鼠等动物骨骼肌中高表达的 miRNA^[4, 9]。其中 miR-1 在猪肥育期表达量最高,而在其他时期呈中等表达水平;miR-133 在肥育期呈现中等表达,而在胚胎期和新生仔猪中则低表达^[9]。

B. Zhou 等^[25]研究了妊娠第 90 天胎猪和 120 日龄猪背最长肌中 miRNA 表达谱,结果表明,妊娠第 90 天的胎猪中 miR-206、let-7 等的表达丰富,而 120 日龄猪中 miR-1a、miR-133a、miR-26a 和 miR-1826 的表达丰富。有研究表明 miR-143 具有促进正常脂肪细胞分化与脂肪沉积的作用^[26],另外,J. Huang^[27]研究表明 miR-143 可能参与哺乳动物性腺内分泌以及妊娠维持等生殖活动。这说明 miR-143 在哺乳动物的发育和生殖过程中都起到重要作用,可见 miRNA 功能的多样性与复杂性,这也给人们探明 miRNA 功能带来了挑战。

4 结论

本研究挖掘了山羊肌肉组织 microRNA,并获取山羊肌肉 microRNA 表达谱情况及其生物学特征。山羊肌肉组织 miRNA 表达丰富且表达量各异。miRNA 靶基因预测和功能分析表明,很多 miRNA 可能影响一些与动物肌肉发育的细胞信号通路。也为进一步研究 miRNA 调控哺乳动物肌肉发育奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] BAILEY J, LI J. MicroRNAs and ovarian function [J]. *J Ova Res*, 2012, 5: 8-14.

- [2] 徐盛玉, 王定越, 吴 德. MicroRNA 及其对哺乳动物繁殖的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(6): 747-753.
- [3] CARDINALI B, CASTELLANI L, FASANRO P, et al. MicroRNA-221 and microRNA-222 modulate differentiation and maturation of skeletal muscle cells [J]. *PLoS ONE*, 2009, 4(10):1-13.
- [4] CHEN J F, MANDEL E M, THOMSON J M, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation [J]. *Nat Genet*, 2006, 38(2):228-233.
- [5] YAN X C, DING L, LI Y C, et al. Identification and profiling of microRNAs from skeletal muscle of the common carp [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(1):e30925.
- [6] KUHN A R, SCHLAUCH K, LAO R, et al. MicroRNA expression in human airway smooth muscle cells; role of miR-25 in regulation of airway smooth muscle phenotype [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010, 42:506-513.
- [7] LIU X, CHENG Y, ZHANG S, et al. A necessary role of miR-221 and miR-222 in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia [J]. *Circ Res*, 2009, 104:476-487.
- [8] DEY B K, GAGAN J, DUTTA A. miR-206 and miR-486 induce myoblast differentiation by downregulating Pax7 [J]. *Mol Cell Biol*, 2011, 31(6):1329.
- [9] MCDANELD T G, SMITH T P L, DOUMIT M E, et al. MicroRNA transcriptome profiles during swine skeletal muscle development [J]. *BMC Genomics*, 2009, 10:77.
- [10] 韩志玲, 赵德超, 付绍印, 等. 绒山羊骨骼肌 miRNAs 及其靶基因表达谱分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2012, 43(10): 1539-1546.
- [11] 李惠侠, 王振云, 张 震, 等. 高温条件下 miRNA-24 对奶牛乳腺上皮细胞增值与凋亡的影响 [J]. 中国农业科学, 2010, 43(22):4728-4732.
- [12] WANG X G, YU J F, ZHANG Y, et al. Identification and characterization of microRNA from chicken adipose tissue and skeletal muscle [J]. *Poult Sci*, 2012, 91(1):139-149.
- [13] DEO A, CARLSSON J, LINDLOF A. How to choose a normalization strategy for miRNA quantitative real-time (qPCR) arrays [J]. *J BICoB*, 2011, 9(6): 795-812.
- [14] ALLEN E, XIE Z, GUSTAFSON A M, et al. microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants [J]. *Cell*, 2005, 121:207-221.
- [15] GE Y J, SUN Y T, CHEN J. IGF-II is regulated by microRNA-125b in skeletal myogenesis [J]. *J Cell Biol*, 2011, 192(1):69-81.
- [16] KOZOMARA A, GRIFFITHS-JONES S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep sequencing data [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39:D152-D157.
- [17] MESTDAGH P, FEYS T, BERNARD N, et al. High-throughput stem-loop RT-qPCR miRNA expression profiling using minute amounts of input RNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36:e143.
- [18] WEI Y, CHEN S, YANG P, et al. Characterization and comparative profiling of the small RNA transcriptomes in two phases of locust [J]. *Genome Biol*, 2009, 10:R6.
- [19] FU Y, SHI Z, WU M, et al. Identification and differential expression of microRNAs during metamorphosis of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6:e22957.
- [20] 盛熙晖. 应用文库构建法和生物信息学方法鉴定绵羊 microRNA [D]. 北京:中国农业科学院, 2010.
- [21] DRUMMOND M J, MCCARTHY J J, SINHA M, et al. Aging and microRNA expression in human skeletal muscle: a microarray and bioinformatics analysis [J]. *Physiol Genome*, 2011, 43(10):595-603.
- [22] JI Z B, WANG G Z, XIE Z J et al. Identification and characterization of microRNA in the dairy goat (*Capra hircus*) mammary gland by Solexa deep-sequencing technology [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(10): 9361-9371.
- [23] 付绍印 赵德超 赵宏丽, 等. 利用种子序列检测山羊皮肤中 microRNA 靶基因分子方法的建立 [J]. 遗传, 2012, 34(7): 919-926.
- [24] WIENHOLDS E, PLASTERK R H. MicroRNA function in animal development [J]. *FEBS Lett*, 2005, 579:5911-5922.
- [25] ZHOU B, LIU H L, SHI F X, et al. MicroRNA expression profiles of porcine skeletal muscle [J]. *Anim Genet*, 2010, 41(5):499-508.
- [26] YI C, XIE W D, LI F, et al. MiR-143 enhances adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells through targeting the coding region of mouse pleiotrophin [J]. *FEBS Lett*, 2011, 585:3303-3309.
- [27] HUANG J, JU Z, LI Q, et al. Solexa sequencing of novel and differentially expressed microRNAs in testicular and ovarian tissues in Holstein cattle [J]. *Internat J Biol Sci*, 2011, 7(7): 1016-1026.