



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110643607 A

(43)申请公布日 2020.01.03

(21)申请号 201911033322.5

G16B 30/10(2019.01)

(22)申请日 2019.10.28

(71)申请人 沈阳农业大学

地址 110000 辽宁省沈阳市沈河区东陵路
120号

(72)发明人 王泽英 何剑斌 白文林 罗光彬
吴宏平 杨广林 张丽君 李静
岳畅 郑圆媛 郭素玲 惠太宇
孙家明 白智贤 蔡伟东 王延茹
张鑫江

(74)专利代理机构 西安铭泽知识产权代理事务
所(普通合伙) 61223

代理人 崔瑞迎

(51)Int.Cl.

C12N 15/113(2010.01)

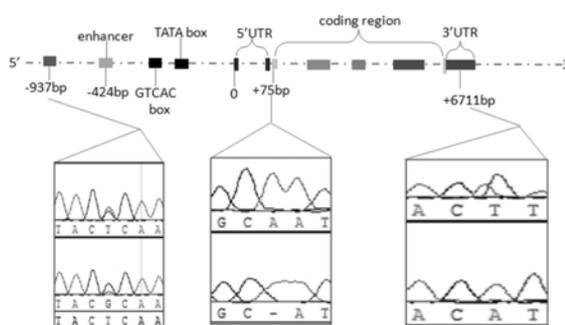
权利要求书1页 说明书3页
序列表1页 附图4页

(54)发明名称

辽育白牛与繁殖功能相关的microRNA及其
获得方法

(57)摘要

本发明属于生物技术领域,更具体而言,涉
及辽育白牛与繁殖功能相关的microRNA及其获
得方法。通过对辽育白牛IGF-1与PRL基因的克
隆,并对其进行生物信息分析及靶标microRNA的
筛选,获得辽育白牛与繁殖功能相关的
microRNA,具体为bta-miR-365-3p和bta-miR-
2393,bta-miR-365-3p和bta-miR-2393分别参与
IGF-1和PRL基因表达的调控,在IGF-1和PRL基因
表达中起作用,且与辽育白牛繁殖性能有关。



1. 辽育白牛与繁殖功能相关的microRNA,其特征在于,所述microRNA为bta-miR-365-3p和bta-miR-2393,所述bta-miR-365-3p的核苷酸序列为:5' -UAAUGCCCCUAAAAAUCCUUAU-3',如SEQ ID NO:1所示,所述bta-miR-2393的核苷酸序列为:5' -UAGAUUUUUUGUUUUCUUUU-3',如SEQ ID NO:2所示。

2. 如权利要求1所述的辽育白牛与繁殖功能相关的microRNA,其特征在于,所述bta-miR-365-3p的获得步骤如下:

S1,克隆测序得到辽育白牛IGF-1基因的3'端非翻译区;

S2, MicroInspector分析IGF-1基因的3'端非翻译区可以结合的microRNA;

S3,使用Target Scan寻找IGF-1基因中潜在的保守结合microRNA,即为靶microRNA;

S4,使用RNAhybrid将靶microRNA分别与辽育白牛PRL基因3'端突变前与突变后结合,进行验证。

3. 如权利要求1所述的辽育白牛与繁殖功能相关的microRNA,其特征在于,所述bta-miR-2393的获得步骤如下:

S1,克隆测序得到辽育白牛PRL基因的3'端非翻译区;

S2, MicroInspector分析PRL基因的3'端非翻译区可以结合的microRNA;

S3,使用Target Scan寻找PRL基因中潜在的保守结合microRNA,即为靶microRNA;

S4,使用RNAhybrid将靶microRNA分别与辽育白牛PRL基因3'端突变前与突变后结合,进行验证。

4. 如权利要求1所述辽育白牛与繁殖功能相关的microRNA在制备具有调节辽育白牛繁殖功能的产品中的应用。

辽育白牛与繁殖功能相关的microRNA及其获得方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,更具体而言,涉及辽育白牛与繁殖功能相关的microRNA及其获得方法。

背景技术

[0002] 辽育白牛是辽宁省以夏洛莱牛为父本、以当地黄牛为母本级进杂交后,从其第4代的杂交群中选择优良个体再进行横交和有计划筛选培育,并采用开放式育种体系,坚持档案组建群,从而形成了含有93.75%夏洛莱牛血统的稳定群体。辽育白牛体型大,体质健壮,性情温和,且抗寒能力突出,抗逆性强,尤其适应当地的粗放式饲养环境。易于饲养,生长速度快。

[0003] miRNAs是一种20-25个核苷酸大小的非编码内源性RNAs,它通过miRNAs的种子序列(2-8核苷酸在其5'端)与靶mRNAs的3'UTR端互补的部分进行典型的碱基配对来调节基因转录后的表达。在许多生物上已经研究建立了在各种组织的正常发育和分化中miRNAs扮演着重要的角色。miRNAs在体细胞和生殖细胞的发育过程中均发挥着至关重要的作用,当它独立针对miRNA过程酶Dicer酶时,导致生殖系干细胞的分裂和原始生殖细胞的发育受损。同一个miRNA与基因的3'UTR区多个位点结合能增强对基因的调节能力。随着对miRNA的深入研究,已从识别miRNA,阐明作用机制,转移到鉴定其功能。

[0004] 目前关于与辽育白牛繁殖功能相关的microRNA的研究较少,为了寻找与辽育白牛繁殖性状相关的线索,为辽育白牛的育种工作提供理论基础,我们需要寻找更多的功能microRNA。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供辽育白牛与繁殖功能相关的microRNA,所述microRNA为bta-miR-365-3p和bta-miR-2393,所述bta-miR-365-3p的核苷酸序列为:5'-UAAUGCCCCUAAAAUCCUUAU-3',如SEQ ID NO:1所示,所述bta-miR-2393的核苷酸序列为:5'-UAGAUUUUUUGUUUUCUUU-3',如SEQ ID NO:2所示。

[0006] 进一步的,所述bta-miR-365-3p的筛选步骤如下:

[0007] S1,克隆测序得到辽育白牛IGF-1基因的3'非翻译区;

[0008] S2, MicroInspector分析IGF-1基因的3'非翻译区可以结合的microRNA;

[0009] S3,使用Target Scan寻找IGF-1基因中潜在的保守结合microRNA,即为靶microRNA;

[0010] S4,使用RNAhybrid将靶microRNA分别与辽育白牛PRL基因3'端突变前与突变后结合,进行验证。

[0011] 进一步的,所述bta-miR-365-3p的筛选步骤如下:

[0012] S1,克隆测序得到辽育白牛PRL基因的3'非翻译区;

[0013] S2, MicroInspector分析PRL基因的3'非翻译区可以结合的microRNA;

[0014] S3,使用Target Scan寻找PRL基因中潜在的保守结合microRNA,即为靶microRNA;
[0015] S4,使用RNAhybrid将靶microRNA分别与辽育白牛PRL基因3'端突变前与突变后结合,进行验证。

[0016] 本发明的另一个目的是提供上述辽育白牛与繁殖功能相关的microRNA在制备具有调节辽育白牛繁殖功能的产品中的应用。

[0017] 本发明的有益效果:

[0018] 本发明的实验证明,bta-miR-365-3p的SNP变化前后对IGF-1的表达高低及是否表达有一定的影响,同样bta-miR-2393的SNP变化前后对RPL的表达高低及是否表达有一定的影响,bta-miR-365-3p和bta-miR-2393分别参与IGF-1和PRL基因表达的调控,为完善与辽育辽育白牛繁殖性能相关基因的调控提供依据。

附图说明

[0019] 图1为IGF-1基因的SNP。

[0020] 图2为bta-miR-365-3p与IGF-1基因3' UTR结合情况。

[0021] 图3为bta-miR-365-3p与IGF-1基因3' UTR发生SNP后结合情况。

[0022] 图4为PRL基因的SNPs。

[0023] 图5为bta-miR-2393与PRL基因3' UTR结合情况。

[0024] 图6为bta-miR-2393与PRL基因3' UTR发生SNP后结合情况。

具体实施方式

[0025] 下面结合附图和具体实施例对本发明进行详细说明,但不应理解为本发明的限制。如未特殊说明,下述实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段,下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0026] 实施例1

[0027] 本实施例提供的辽育白牛与繁殖功能相关的microRNA,所述microRNA为bta-miR-365-3p和bta-miR-2393,所述bta-miR-365-3p的核苷酸序列是:5'-UAAUGCCCCUAAAAUCCUUAU-3',如SEQ ID NO:1所示,所述bta-miR-2393的核苷酸序列为:5'-UAGAUUUUUUGUUUUCUUUU-3',如SEQ ID NO:2所示。

[0028] 1.bta-miR-365-3p的获得,步骤如下:

[0029] S1,克隆测序得到辽育白牛IGF-1基因的3'非翻译区,发现潜在功能性SNP对miRNA靶标结合产生实质性影响,图1所示。

[0030] S2,MicroInspector分析IGF-1基因的3'非翻译区可以结合的microRNA,分析发现,IGF-1基因的3'UTR可以结合11个miRNA,分别为bta-miR-2360,bta-miR-2472,bta-miR-658,bta-miR-2356,bta-miR-2881bta-miR-2893,bta-miR-1307,bta-miR-2302,bta-miR-2472,bta-miR-2442,bta-miR-2309,而发生突变后,靶标miRNA结合情况并未发生变化。

[0031] S3,使用Target Scan寻找IGF-1基因中潜在的保守结合microRNA,分析发现存在4个不同的IGF-1转录本,分析发现编号为NM_001111285在牛上面不存在保守结合的miRNA,分别是bta-miR-1306,bta-miR-346,bta-miR-2399,bta-miR-150,bta-miR-183,bta-miR-763,bta-miR-2350,bta-miR-1251,bta-miR-2326,bta-miR-2328,bta-miR-2394。而编号为

NM_000618, NM_001111284的转录本所结合的靶miRNA均一样,只是位置发生了改变,靶miRNA为bta-miR-365-3p;

[0032] S4,使用RNAhybrid将潜在的保守结合microRNA分别与辽育白牛PRL基因3'端突变前与突变后结合,进行验证。

[0033] 使用RNAhybrid分析bta-miR-365-3p二级结构,发现bta-miR-365-3p的序列为5'-UAAUGCCCCUAAAAUCCUUAU-3',其长度为22bp,其靶标前体长度为23bp,结合自由能为-12.6kcal/mol。使用RNAhybrid将bta-miR-365-3p分别与辽育白牛IGF-1基因3'端突变前与突变后结合,如图2和图3所示,发现bta-miR-365-3p仍然结合,但是位置发生了改变,向前移动了25bp。

[0034] 2. bta-miR-2393的获得,步骤如下:

[0035] S1,克隆测序得到辽育白牛PRL基因的3'非翻译区,发现+45位点C缺失突变,+52位点G/A对bta-miR-2393与PRL的3'UTR结合产生了影响,结合度降低,如图4所示。

[0036] S2, MicroInspector分析PRL基因的3'非翻译区可以结合的microRNA,分析发现PRL基因的3'UTR可以结合5个miRNA,分别为bta-miR-206, bta-miR-2893, bta-miR-877, bta-miR-2460, bta-miR-99b。而发生SNPs后,靶标miRNA结合情况并未发生变化。

[0037] S3,使用Target Scan寻找PRL基因中潜在的保守结合miRNA,分析发现存在两个不同的PRL转录本,其中长度为154bp大小的3'UTR中存在一个潜在的保守结合miRNA为bta-miR-2393。

[0038] S4,使用RNAhybrid将潜在的保守结合microRNA分别与辽育白牛PRL基因3'端突变前与突变后结合。

[0039] 使用RNAhybrid分析bta-miR-2393二级结构,发现bta-miR-2393序列为5'-UAGAUUUUUUGUUUUCUUUU-3',且长度为20bp,其靶标前体长度为23bp,结合自由能为-7.9kcal/mol。使用RNAhybrid将bta-miR-2393分别与辽育白牛PRL基因3'端突变前与突变后结合,如图5和图6所示,发现bta-miR-2393仍然结合,但是位置发生了改变,向前移动了1bp,且自由能变化了+0.1kcal/mol。

[0040] 需要说明的是,本发明权利要求书中涉及数值范围时,应理解为每个数值范围的两个端点以及两个端点之间任何一个数值均可选用,为了防止赘述,本发明描述了优选的实施例。

[0041] 尽管已描述了本发明的优选实施例,但本领域内的技术人员一旦得知了基本创造性概念,则可对这些实施例作出另外的变更和修改。所以,所附权利要求意欲解释为包括优选实施例以及落入本发明范围的所有变更和修改。

[0042] 显然,本领域的技术人员可以对本发明进行各种改动和变型而不脱离本发明的精神和范围。这样,倘若本发明的这些修改和变型属于本发明权利要求及其等同技术的范围之内,则本发明也意图包含这些改动和变型在内。

序列表

<110> 沈阳农业大学

<120> 辽育白牛与繁殖功能相关的microRNA及其获得方法

<160> 2

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> 辽育白牛

<400> 1

uaaugccccc uaaaauccuu au 22

<210> 2

<211> 20

<212> RNA

<213> 辽育白牛

<400> 2

uagauuuuuu guuuucuuuu 20

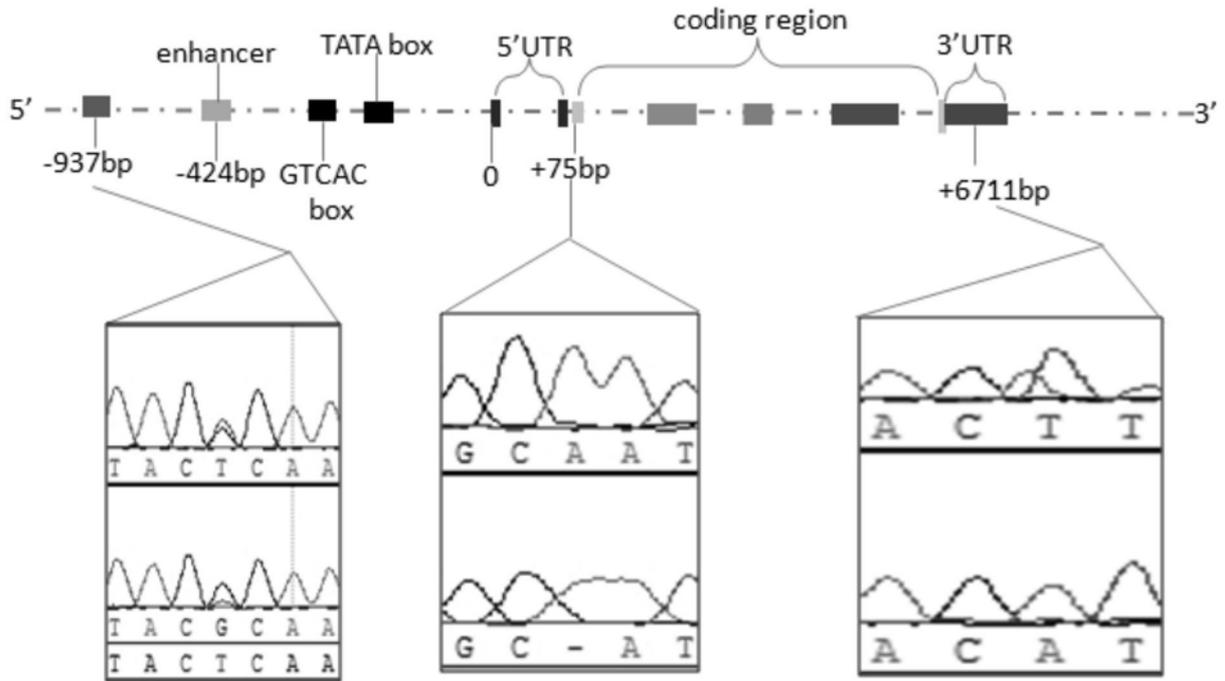


图1



RESULT

BiBiServ
Bielefeld University Bioinformatics Server

RNAhybrid

If you encounter any problems using RNAhybrid please send a [request](#)

Version: RNAhybrid 2.2
 searching
 dataset: 1
 nde of Anonymous_Sequence: -40.199993
 Individual hits

IGF-1-standard

dataset: 1
TARGET : Anonymous_Sequence
 length: 421
MIRNA : Anonymous_Sequence
 length: 22

nfe: -17.2 kcal/mol
 p-value: undefined

position **225**
 target 5' A A GUGC A 3' nfe: -17.2 kcal/mol
 G GGA AGGAA
 C CCU UCCU
 miRNA 3' UAAUG AAAAA AU 5'

plot as [png](#), [jpeg](#) or [ps](#) (in a new window)

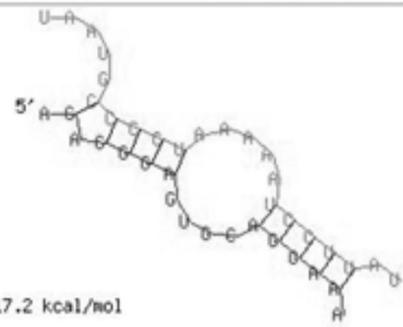


图2

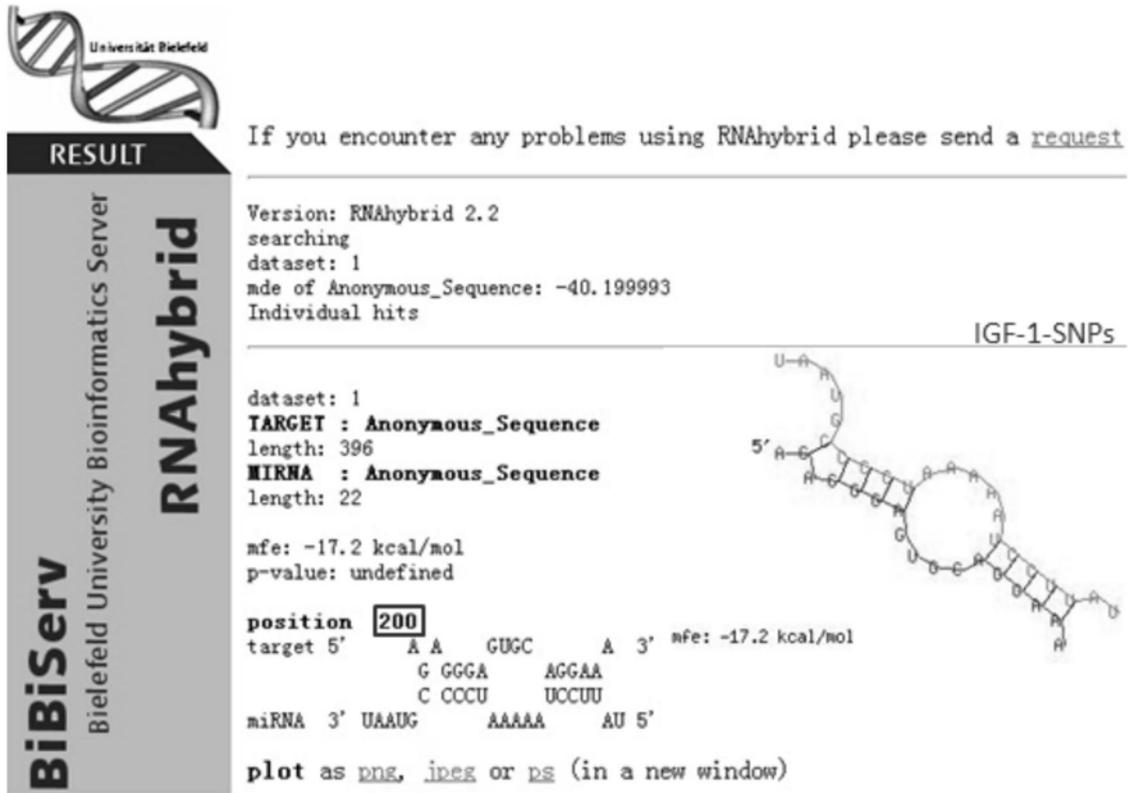


图3

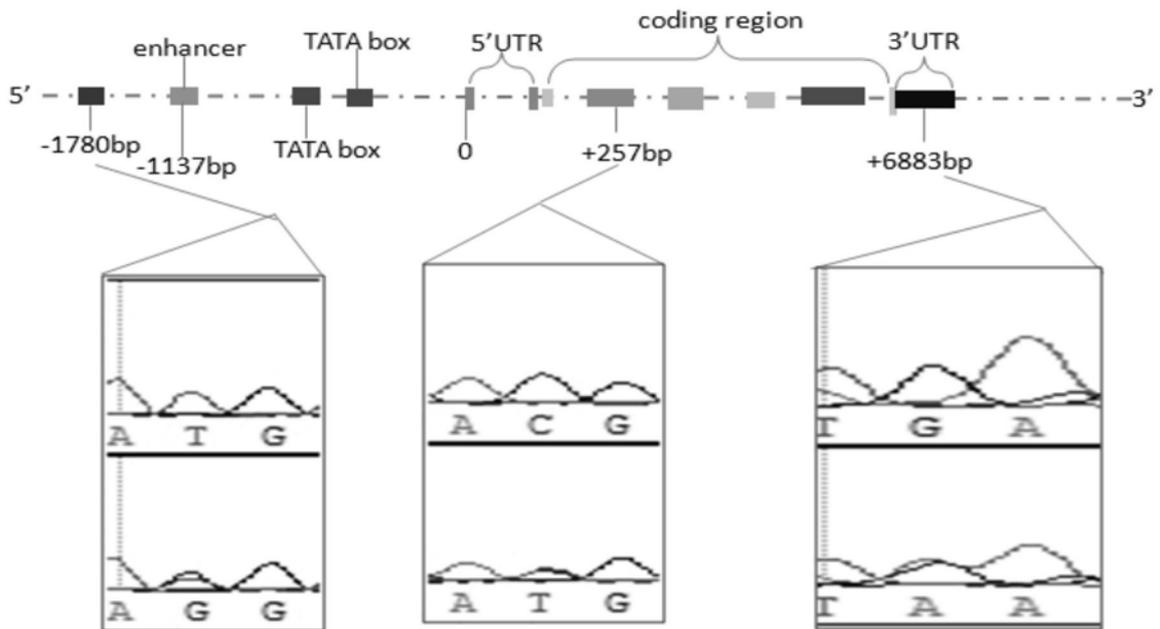


图4



RESULT

BiBiServ
Bielefeld University Bioinformatics Server

RNAhybrid

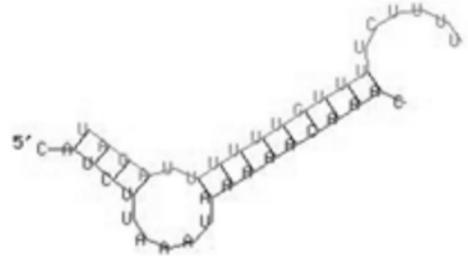
If you encounter any problems using RNAhybrid please send a [request](#)

Version: RNAhybrid 2.2
searching
dataset: 1
mfe of Anonymous_Sequence: -27.899998
Individual hits

PRL-SNPs

dataset: 1
TARGET : Anonymous_Sequence
length: 179
MIRNA : Anonymous_Sequence
length: 20

mfe: **-13.1 kcal/mol**
p-value: undefined



position **134** mfe: -13.1 kcal/mol
target 5' C UAAAU C 3'
AUCU AAAAAAAA
UAGA UUUUUUUU
miRNA 3' U UCUUUU 5'

plot as [png](#), [jpeg](#) or [ps](#) (in a new window)

图6