

# 绒山羊骨骼肌 miRNAs 及其靶基因表达谱分析

韩志玲, 赵德超, 付绍印, 吕晓曼, 高爱琴, 张文广\*, 李金泉\*

(内蒙古农业大学动物科学学院 动物遗传育种与繁殖自治区重点实验室, 呼和浩特 010018)

**摘要:** 本试验选取了 miR-1、miR-133、miR-24、miR-122、miR-103、miR-143、let7 7 个 miRNAs, 旨在对其表达量及靶基因表达谱进行分析。选用 4 只绒山羊的背部和后腿肌肉提取 RNA, 反转录后, 利用 SYBR 荧光定量 PCR 来检测各 miRNAs 的表达量, 并采用靶基因指纹图谱(MTFP)技术获得各 miRNAs 的靶基因表达谱。结果表明, miRNA 表达量依次为: miR-1 > miR-133 > miR-24 > let7 > miR-143 > miR-103 > miR-122, 其中 miR-1 和 miR-133 表达规律相似, 且这 7 个 miRNAs 在成羊中的表达量均高于羔羊; 此外, miRNAs 表达量的差异还受性别影响, 且 miRNA 表达量与靶基因个数及其表达量之间具有相关性。对 5 个 miRNAs 的 10 个靶基因测序并比对, 表明靶基因分别编码与信号转导、细胞周期等相关的蛋白。通过这 7 个 miRNAs 与其靶基因表达的分析, 揭示了肌肉发育相关 miRNAs 及脂肪发育相关 miRNAs 在绒山羊骨骼肌中的异同, 有利于绒山羊肉质基因的研究。

**关键词:** miRNA; 靶基因; 表达; 绒山羊; 骨骼肌

中图分类号: S827; S813.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)10-1539-08

## The Analysis of miRNAs and Their Target Expression Profiles in Cashmere Goat Skeletal Muscle

HAN Zhi-ling, ZHAO De-chao, FU Shao-yin, LV Xiao-man, GAO Ai-qin,  
ZHANG Wen-guang\*, LI Jin-quan\*

(Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Inner Mongolia Autonomous Region, College of Animal Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

**Abstract:** Seven muscle and adipose related miRNAs, including miR-1, miR-133, miR-24, miR-122, miR-103, miR-143 and let7 were selected to analyze their expression and target expression profiles. Muscles RNA from back and hind leg muscle of 4 cashmere goats were extracted, after reverse-transcription, SYBR TaqMan PCR was used to detect gene expression, and miRNA target expression profiles were got by PAGE electrophoresis and MiRNA Targets Figure Print (MTFP) technique. The result showed that the expression of miRNA were as follows: miR-1 > miR-133 > miR-24 > let7 > miR-143 > miR-103 > miR-122, the expression patterns of miR-1 and miR-133 were similar, and the expression levels of all miRNAs in adult goat were higher than that in lamb; moreover, the difference of miRNAs expression levels were also affected by gender, and they had relationship with number and expression levels of target genes. 10 target genes in 5 miRNAs were sequenced and Blast annotation, which coded proteins related to signal transduction, cell cycle, and so on. The expression analysis of 7 miRNAs and their target genes showed differences and similarities between muscle development related miRNAs and adipose development related miRNAs in cashmere goat skeletal muscle, which were favorable to the research for

收稿日期: 2012-02-10

基金项目: 国家科技支撑项目(2011BAD28B05); 国家自然科学基金(30960246); 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-40-05); 公益性行业(农业)科研项目(201003019)

作者简介: 韩志玲(1986-), 女, 山西朔州人, 硕士生, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: hanzhiling1986@163.com; 赵德超(1987-), 男, 河北沧县人, 硕士生, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: zhaodechao19870324@163.com。二者对本文具同等贡献

\* 通讯作者: 张文广, E-mail: atcgmbi@yahoo.com.cn; 李金泉, E-mail: lijinquan\_nd@126.com

meat quality related genes in cashmere goat.

**Key words:** miRNA; target gene; expression; cashmere goat; skeletal muscle

近年来基因转录后调控逐渐成为研究热点,其中 miRNA 的调控作用尤为重要。MicroRNA (miRNA) 是一组不编码蛋白质的小 RNA,由一段长约 80 bp 的前体 RNA(pre-miRNA)经 Dicer 酶剪切后生成,广泛存在于真核生物中<sup>[1-3]</sup>。miRNA 主要通过与其靶 mRNA 的 3'UTR 结合使其降解或抑制其表达,进而在转录后水平调控基因的表达<sup>[4-5]</sup>。目前的预测方法需要基于较完整的基因组信息才能进行预测<sup>[6]</sup>,对于预测无参考基因组物种中 miRNA 的靶基因,就需要借助新的预测方法,实验室根据 miRNA 种子序列的特殊性,开发了靶基因指纹图谱技术,即 MTFP(MiRNA Targets Finger Print, 专利号 201210038354.6),为靶基因预测提供了一种新的分子方法,具有很高的实用价值。

绒山羊作为内蒙古地区特色家畜品种之一,其肉质具有高蛋白、低能量、低胆固醇、氨基酸含量丰富等特点<sup>[7]</sup>,有很高的营养价值。然而一直以来对 miRNA 在绒山羊肌肉中的研究较少,已有研究证实 miRNA 在小鼠、猪等物种中对骨骼肌发育有重要作用<sup>[8-11]</sup>,如 miR-1 能够促进成肌细胞分化,抑制成肌细胞增殖,而 miR-133 则相反<sup>[4,12]</sup>;miR-24 是促成肌分化因子,在 TGF- $\beta$  模型中随成肌分化过程的表达而升高<sup>[13]</sup>;miR-122 在猪肝脏中特异和大量的表达,推测其可能与脂肪代谢和肝脏的动态平衡有关<sup>[14]</sup>;miR-143 在分化的脂肪细胞中表达水平增加,抑制 miR-143 就能有效抑制脂肪细胞分化,并可能通过靶基因 *ERK5* 起作用<sup>[15]</sup>;miR-103 在脂肪细胞中含量丰富,并在 3T3-L1 脂肪细胞形成时上调。此外,miR-143 和 miR-103 的异常表达能够促进脂肪细胞的形成<sup>[16]</sup>;let7 在细胞分化、肌肉发育等过程中起重要作用<sup>[17-18]</sup>。基于以上研究结果,试验选取与肌肉发育相关的 miR-1、miR-133、miR-24 及与脂肪发育相关的 miR-122、miR-143、miR-103,并以在各组织中都稳定表达的 let7 作为对照 miRNA,以期通过分析 miRNA 和其靶基因表达的特点,来探究在绒山羊骨骼肌发育过程中这 2 类 miRNA 表达的异同,并推测其所起的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本试验的样品来自内蒙古白绒山羊种羊场,分别选取 3 岁和周岁的公母羊各 2 只,处死后,立即从

后腿和背部采集肌肉组织。后腿于胫骨后肌处取肌肉组织,背部于第 12~13 肋骨处取背最长肌,采集后置液氮迅速冷冻,之后置于 -80 °C 备用。

### 1.2 方法

1.2.1 RNA 提取及反转录 分别用 RNAprep 纯动物组织总 RNA 提取试剂盒和 Trizol 试剂同步提取,试剂盒提取的大片段 RNA 用来筛选 miRNA 的靶基因,Trizol 试剂提取的小片段 RNA 用来做 miRNA 定量 PCR。所提 RNA 用 Biotek Synergy H4 Hybrid Reader 酶标仪测定吸光度及浓度,并用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。之后用 TaKaRa 公司的 PrimeScript RT reagent Kit mRNA 快速反转录试剂盒和 One Step PrimeScript miRNA cDNA Synthesis Kit (Perfect Real Time)试剂盒分别进行反转录。

1.2.2 引物设计与合成 根据 miRbase 中提供的 miRNA 成熟序列,利用 MTFP 技术原理设计了用于筛选靶基因和荧光定量 PCR 所需的特异上游引物(如表 1),靶基因筛选下游通用引物序列为 5'-CAA-GACTCGTAGCCTGTG-3' (专利号 201210038354.6),miRNA 荧光定量 PCR 下游通用引物序列为 5'-GTCAGATGACGATACGACGTAG-3'。引物由 Invitrogen 公司合成。

1.2.3 荧光定量 PCR 以 miRNA 反转录产物为模板,SYBR 为荧光染料,使用 SYBR Premix Ex Taq™ II (TaKaRa 公司)进行荧光定量 PCR 扩增,所用仪器为 BioKet。每个样本重复测定 3 次,并对各 miRNA 做标准曲线。定量完成后得到各 miRNA 在不同样本中的 Ct 值,以 5S RNA 为内参基因,采用  $\Delta\Delta Ct$  法计算目的基因的相对表达量。将 PCR 产物克隆到 pGM-T 载体,并测序验证引物设计的正确性。

1.2.4 miRNA PAGE 电泳图谱 利用表 1 所设计的引物做 PCR,设计不同退火温度梯度,用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,选取合适退火温度用 12% PAGE 电泳进行靶基因检测,即得到 miRNA 靶基因条带,之后对各条带用 Genetool 软件进行分析,以 DL500 中的 200 bp 片段为基准,得到目的 miRNA 靶基因的相对表达量,相对表达量低于 1% 时认为其不表达。

1.2.5 靶基因条带回收和克隆测序 为了有效

获得靶基因,从 PAGE 胶图上选取单一清晰的共表达条带及特异条带采取切胶的方法回收后进行溶胶,用 DNA 回收试剂盒纯化后连接至 pGM-T 载体

(Tiangen 公司)转化克隆,利用蓝白斑鉴定方法挑取单克隆,之后通过菌落 PCR 鉴定选取阳性结果的基因测序。

表 1 miRNAs 引物序列

Table 1 Primer sequence of miRNAs

名称 Name	靶基因筛选引物 Primers for target reverse transcription	荧光定量 PCR 引物 Primers for SYBR TaqMan PCR
miR-143	GATACTGCGTCTCATCTCA	GCTGAGATGAAGCACTGTAGCTCA
miR-24	GATACTGCGTCTGAGCCA	TGGCTCAGTTCAGCAGGAACAG
miR-1	GATACTGCGTCCATTCCA	CCGCTGGAATGTAAAGAAGTATGTA
miR-133	GATACTGCGTCGGACCAA	TTTGGTCCCCCTCAACCAGCTG
let7	GATACTGCGTCCTACCTC	GGCTGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT
miR-103	GATACTGCGTCTGCTGCA	GAGCAGCATTGTACAGGGCTATGA
miR-122	GATACTGCGTCACACTCCA	GCTGGAGTGTGACAATGGTGTTTG
5S RNA		F:CTCGTCTGATCTCGGAAGCTAA R:CTACAGCACCCGGTATTC

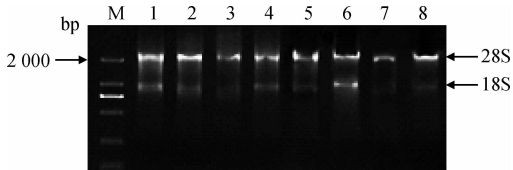
5S RNA 做荧光定量 PCR 的内参基因,F 和 R 表示上游引物和下游引物

5S RNA is internal control gene for SYBR TaqMan PCR,F and R stand for forward and reverse primers, respectively

## 2 结果

### 2.1 RNA 提取结果

用试剂盒提取 RNA 后用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,如图 1 所示 28S 和 18S 有明显条带,且 28S 条带亮度约为 18S 条带的 2 倍,表明大片段 RNA 提取质量较好,可以用于 cDNA 反转录。



M. 相对分子质量标准 DL 2000;1. 成年母羊背最长肌; 2. 成年母羊后腿肌;3. 成年公羊背最长肌;4. 成年公羊后腿肌;5. 母羔羊背最长肌;6. 母羔羊后腿肌;7. 公羔羊背最长肌;8. 公羔羊后腿肌

M. DL2000 marker; 1. Adult ewe longissimus muscle; 2. Adult ewe hind leg muscle; 3. Adult ram longissimus muscle; 4. Adult ram hind leg muscle; 5. Lamb ewe longissimus muscle; 6. Lamb ewe hind leg muscle; 7. Lamb ram longissimus muscle; 8. Lamb ram hind leg muscle

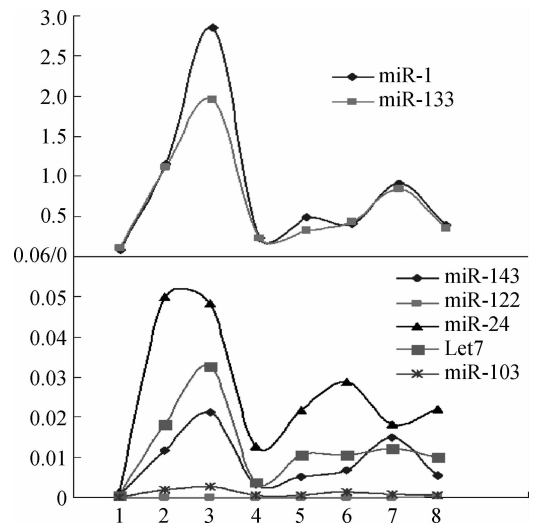
图 1 RNA 电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis for RNA

### 2.2 miRNA 表达量分析

图 2 为各 miRNA 在不同样本间相对表达量的曲线图,由图可知,表达量依次为:miR-1 > miR-133 > miR-24 > let7 > miR-143 > miR-103 > miR-122,以

miR-1 和 miR-133 的表达量为最高。利用 SAS 9.0 软件对这 7 个 miRNA 进行相关性分析,结果显示,miR-1 和 miR-133 之间的相关系数  $r$  在 95% 以上,且  $P < 0.0001$ ,相关性极显著,预示二者可能成对表达。



1. 成年母羊背最长肌;2. 成年母羊后腿肌;3. 成年公羊背最长肌;4. 成年公羊后腿肌;5. 母羔羊背最长肌;6. 母羔羊后腿肌;7. 公羔羊背最长肌;8. 公羔羊后腿肌

1. Adult ewe longissimus muscle; 2. Adult ewe hind leg muscle; 3. Adult ram longissimus muscle; 4. Adult ram hind leg muscle; 5. Lamb ewe longissimus muscle; 6. Lamb ewe hind leg muscle; 7. Lamb ram longissimus muscle; 8. Lamb ram hind leg muscle

图 2 miRNA 定量表达曲线图

Fig. 2 miRNA quantitative expression curve

2.2 miRNA 靶基因分析

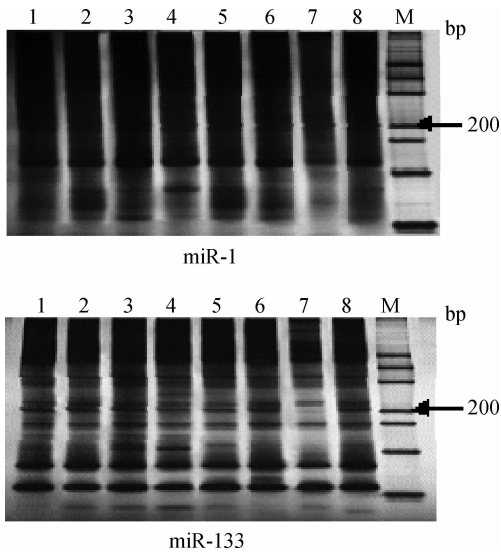
2.2.1 miRNA 靶基因条带分析 图 3 是以

miR-1 和 miR-133 为例的靶基因 PAGE 电泳图,对  
各 miRNA 靶基因条带进行分析(表 2 为各 miRNA

表 2 miRNA 靶基因条带分析结果

Table 2 Analysis result of miRNAs target bands

miRNA	片段长度(均值± 标准差)/bp Fragment length(mean±SD)	相对表达量 (均值±标准差) Relative expression (mean±SD)	miRNA	片段长度(均值± 标准差)/bp Fragment length(mean±SD)	相对表达量 (均值±标准差) Relative expression (mean±SD)
miR-1	720.78±24.22	0.29±0.12	miR-103	424.77±15.48	0.06±0.04
	665.58±13.92	0.11±0.11		348.59±10.73	0.11±0.03
	521.41±10.28	0.10±0.25		307.63±2.58	0.02±0.01
	406.46±19.26	0.51±0.18		268.19±4.76	0.09±0.08
	318.50±17.94	0.25±0.18		208.89±2.06	0.08±0.05
	206.80±6.85	0.09±0.06		186.28±8.36	0.12±0.08
	145.82±3.97	0.11±0.14		107.04±1.69	0.08±0.03
	123.17±4.37	0.39±0.20		101.46±2.01	0.26±0.14
	112.33±3.55	0.94±0.83		81.86±3.11	0.19±0.08
	100.07±4.34	0.30±0.19		68.36±1.70	0.27±0.15
miR-133	63.75±2.73	0.33±0.15	miR-143	633.74±14.17	0.25±0.20
	509.77±24.56	0.28±0.14		561.06±2.83	0.11±0.07
	472.13±4.26	0.10±0.41		531.59±0.00	0.34±0.00
	407.44±10.25	0.45±0.26		492.40±1.52	0.08±0.05
	389.37±4.95	0.09±0.19		439.05±8.76	0.23±0.08
	334.91±15.60	0.30±0.13		302.87±14.82	0.11±0.04
	295.00±0.00	0.03±0.00		288.68±6.15	0.18±0.09
	271.00±0.00	0.03±0.00		220.00±0.00	0.04±0.00
	249.50±8.94	0.10±0.32		211.08±9.57	0.20±0.23
	224.57±2.31	0.50±0.27		187.23±8.42	0.13±0.09
miR-24	201.91±6.75	0.38±0.26	let7	158.96±10.27	0.30±0.37
	177.25±3.59	0.52±0.36		132.69±2.69	0.61±0.23
	137.69±4.76	0.61±0.71		126.56±1.95	0.13±0.54
	112.33±8.98	0.32±0.45		110.64±1.73	0.44±0.18
	106.00±0.00	0.18±0.00		99.81±1.49	0.65±0.32
	78.35±4.09	0.24±0.42		71.27±1.67	0.13±0.17
	73.12±0.73	0.46±0.10		64.83±1.72	0.02±0.05
	63.22±0.95	0.58±1.31		577.81±10.07	0.06±0.02
	408.00±0.00	0.04±0.00		480.51±7.10	0.10±0.06
	325.16±16.07	0.23±0.11		409.07±2.10	0.02±0.08
miR-122	277.23±3.72	0.40±0.17	let7	381.33±7.04	0.02±0.01
	249.57±4.71	0.30±0.11		355.59±10.12	0.03±0.04
	214.94±3.61	0.26±0.11		312.16±10.79	0.03±0.06
	140.69±3.21	0.51±0.25		292.02±2.80	0.15±0.44
	115.36±2.58	0.29±0.09		272.04±3.79	0.20±0.25
	80.34±5.89	0.40±0.20		258.55±3.27	0.12±0.10
	648.00±0.00	0.05±0.00		235.35±4.27	0.15±0.05
	603.00±0.00	0.01±0.00		213.18±3.66	0.17±0.18
	526.00±0.00	0.02±0.00		163.52±12.31	0.08±0.03
	472.10±9.95	0.18±0.23		148.40±5.38	0.05±0.03
miR-122	366.98±15.12	0.34±0.20	let7	138.33±2.24	0.05±0.05
	301.98±13.84	0.47±0.29		123.59±2.57	0.11±0.10
	276.19±4.41	0.41±0.11		116.91±2.49	0.03±0.03
	200.00±0.00	0.07±0.00		109.74±3.34	0.12±0.09
	173.16±5.66	0.27±0.14		100.00±0.00	0.03±0.00
	135.18±6.92	0.18±0.09		86.11±1.26	0.11±0.05
	124.18±3.47	0.23±0.11		76.96±1.44	0.14±0.05
	98.13±4.51	0.14±0.10		53.70±0.94	0.06±0.02
	83.41±1.37	0.18±0.36			
	79.68±4.76	0.10±0.13			

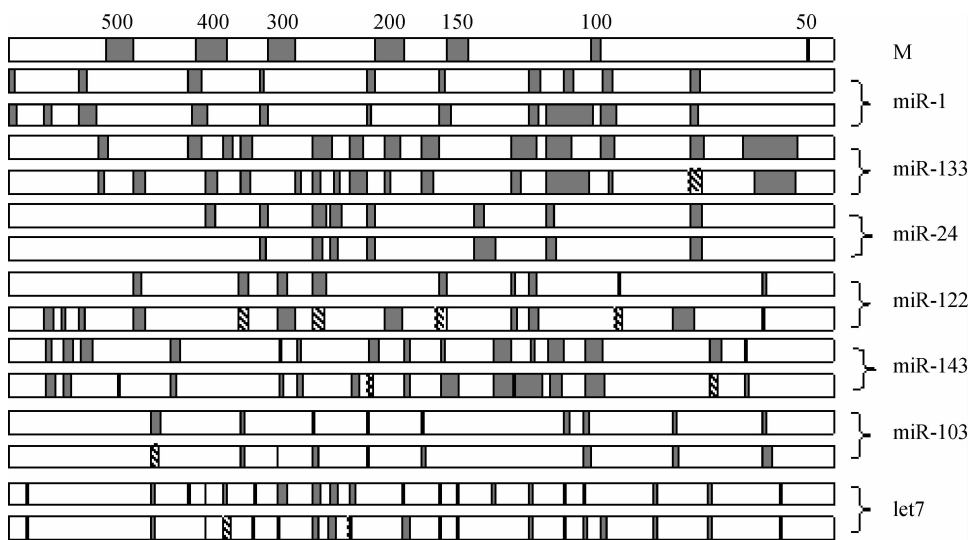


1. 成年母羊背最长肌;2. 成年母羊后腿肌;3. 成年公羊背最长肌;4. 成年公羊后腿肌;5. 母羔羊背最长肌;6. 母羔羊后腿肌;7. 公羔羊背最长肌;8. 公羔羊后腿肌;M. DNA 相对分子质量标准 DL500

1. Adult ewe longissimus muscle; 2. Adult ewe hind leg muscle; 3. Adult ram longissimus muscle; 4. Adult ram hind leg muscle; 5. Lamb ewe longissimus muscle; 6. Lamb ewe hind leg muscle; 7. Lamb ram longissimus muscle; 8. Lamb ram hind leg muscle; M. DNA marker DL500

图 3 miR-1 和 miR-133 靶基因 PAGE 电泳图

Fig. 3 PAGE electrophoresis for miR-1 and miR-133 target genes



M. DNA 相对分子质量标准 DL500;各组 miRNA 的 2 个图谱分别为背最长肌(上)和后腿肌(下),斜线条带为测序所得条带

M. DNA marker DL500. The two profiles are longissimus(upper) and hind leg(lower) muscle for 7 miRNAs, respectively;The oblique lines bands are target bands by sequencing

图 4 miRNAs 组织间靶基因指纹图谱

Fig. 4 miRNAs target gene fingerprint profiles between tissues

靶基因条带整理结果),筛选到的靶基因分别为:miR-1 11 条,miR-133 17 条,miR-24 8 条,miR-122 14 条,miR-143 17 条,miR-103 10 条,let7 21 条。

2.2.2 同一 miRNA 在不同组织靶基因的差异性分析 对同一 miRNA 在背最长肌和后腿肌 2 个组织靶基因的表达量进行 T 检验,得到差异性表达的靶基因条带,以及这 2 个部位中特异的靶基因条带(表 3)。根据各 miRNA 在背最长肌和后腿肌中靶基因条带片段大小和相对表达量的均值,绘制如图 4 所示的靶基因指纹图谱。

2.2.3 靶基因测序结果 将测序所得的靶基因序列在 NCBI 中与全部物种的非冗余数据库进行 Blast 序列比对<sup>[19-20]</sup>,寻找同源基因,限定相似性 > 94%,得到 5 个 miRNA 的 10 个靶基因(图 4),将这些靶基因序列提交至 GenBank,登录号为 JQ692317 ~ JQ692326。

表 4 为靶基因比对结果及其编码的蛋白,其中与线粒体基因具有同源性的 mRNA 都存在于山羊线粒体,而其他靶基因序列大多与牛具有高度相似性。已有的研究表明,miRNA 调控的靶基因涉及生物发育的多种生物学过程,本试验的研究结果也支持了这一结论,如 SDHB 涉及琥珀酸氧化,与线粒体功能障碍和肿瘤发生有关;PKM2 编码的丙酮酸激酶 2 与肿瘤细胞增殖和存活有关;SYNM 编码的中间丝蛋白作为支撑蛋白,与细胞有丝分裂有关等。

表 3 相同 miRNA 在不同组织中的特异及差异表达的靶基因条带

Table 3 The specific and differential expression target bands in different tissues for same miRNA

miRNA	片段长度/bp Fragment length	背最长肌 <i>Longissimus</i> muscle	后腿肌 Hind leg muscle
miR-1	665.58±13.92	-	+
	100.07±4.34*	+	++
miR-133	472.13±4.26	-	+
	389.37±4.95	+	-
	295.00±0.00	-	+
	271±0.00	-	+
	201.91±6.75*	+	++
	112.33±8.98	+	-
	106±0.00	-	+
miR-24	408.00±0.00	+	-
	140.69±3.21*	++	+
miR-122	648±0.00	-	+
	603±0.00	-	+
	526±0.00	-	+
	200±0.00	-	+
	83.41±1.37	-	+
miR-103	307.63±2.58	-	+
	268.19±4.76*	+	++
miR-143	107.04±1.69	+	-
	531.59±0.00	+	-
	492.40±1.52	-	+
let7	220.00±0.00	-	+
	413.64	+	-
let7	138.33±2.24	+	-
	100.81±0.00	-	+

+. 表示有;-. 表示无;++. 表示表达量较高.\*. 表示在 2 个部位中的表达存在显著差异( $P<0.05$ )

+. Existence; -. No existence; ++. The higher expression level. \*. The differential expression are significant in two tissues ( $P<0.05$ )

### 3 讨论

荧光定量和靶基因分析表明,与肌肉发育相关

的 miRNA 及与脂肪发育相关的 miRNA 在表达量及靶基因图谱中具有共同特征。首先,通过定量曲线图可知这 7 个 miRNA 均在山羊骨骼肌中表达,虽然各 miRNA 表达模式不同,但大多都在成年公羊背最长肌中有较高表达。各 miRNA 在幼年羊中的表达量大多低于成年羊,表明,miRNA 随生长阶段不同表达量也不同,且表达量有上升趋势;此外在背最长肌中成年母羊的表达量均远远低于成年公羊,在后腿肌中的表达量成年母羊高于成年公羊,说明在同一部位表达量的差异与性别相关。其次,试验通过高通量的 MTFP 技术共获得了 7 个 miRNA 的 98 个靶基因(表 2),并绘制了不同部位的靶基因指纹图谱(图 4),从图谱可知各 miRNA 在背最长肌和后腿肌中的靶基因表达量差别较小,且 MTFP 片段长度多集中在 100~400 bp 之间。此外,本试验所分析的 2 类组织特异性 miRNA 在定量结果和靶基因图谱中也存在明显差异。由定量结果可知,miR-1 和 miR-133 属于高表达组,表达量高于内参基因 5S RNA,与之前关于 miR-1 与 miR-133 是骨骼肌特异性 miRNA 的报道相一致;其余 miRNA 的表达量均低于 5S RNA,其中 miR-24 虽然在山羊骨骼肌中表达量偏低,但仍高于低表达组中的其余 miRNA,说明在山羊骨骼肌中肌肉相关 miRNA 的表达量高于脂肪相关 miRNA。此外由靶基因指纹图谱可知肌肉相关 miRNA 调控的靶基因数较少,但靶基因条带较宽,表达量较高;而与脂肪发育相关的 miRNA 调控较多的靶基因,但靶基因的表达量较低;let7 作为在各组织中稳定表达的 miRNA,具有最多的靶基因条带,说明 miRNA 表达量与其靶基因个数及其表达量之间具有一定的相关性。

由 miR-1 和 miR-133 具有相似的表达模式可以推测,尽管这 2 种肌肉特异性 miRNA 作用相反,但在骨骼肌中可能成对表达,共同调节骨骼肌的发育过程。这与之前 Chen 等发现它们位于染色体的相邻位置且常同时表达的结论一致<sup>[12]</sup>。以 miR-1 和 miR-133 为例对其靶基因电泳图进行分析可知,miR-1 在 120 bp 附近存在 1 条清晰且高表达的靶基因条带,而 miR-133 在 50~100 bp 之间存在 2 条清晰并高表达的靶基因条带,这种靶基因条带特征即为靶基因的谱征,可作为区分不同 miRNA 的依据。

靶基因测序后通过 Blast 比对得到了 5 个 miRNA 的 10 个靶基因,其中匹配基因最多的是线粒体基因,其核心亚基是线粒体膜呼吸链 NADH 脱氢

酶,在 NADH 到呼吸链的电子转移中起作用。线粒体是真核细胞内的能量转换器,不仅通过氧化磷酸化生成 ATP、在细胞能量供给中起决定性作用,还在生长发育、凋亡、衰老过程中起重要作用;miR-122 调控的 *ALDOA* 基因在成年骨骼肌中大量产

生,还与肌病和溶血性贫血有关<sup>[21]</sup>;miR-143 调控的 *TLK2* 与染色体组装、DNA 复制等有关,其编码的丝氨酸/苏氨酸激酶参与信号转导等。这些比对结果表明,预测到的靶基因与多种细胞生物学过程有关,进而可能参与骨骼肌的发育<sup>[22]</sup>。

表 4 靶基因测序结果

Table 4 Sequencing result for target genes

miRNA	靶基因片段长度/bp (登录号) Length of target genes (Accession number)	Blast 比对结果(登录号) Result for blast (Accession number)	编码蛋白 Coding protein
miR-133	295(JQ692319)	SYNM(NM_001191453)	中间丝蛋白
miR-122	99(JQ692322)	PKM2(NM_001205727.1)	丙酮酸激酶 2
	177(JQ692323)	ALDOA(NM_001101915.1)	醛缩酶 A
	278(JQ692324)	线粒体 D-loop(JN366398.1)	无
	352(JQ692325)	线粒体 D-loop(DQ188891.1)	无
miR-143	72(JQ692320)	线粒体(GU295658.1)	NADH 脱氢酶亚基 4
	201(JQ692321)	TLK2(NM_001192827.1)	丝氨酸/苏氨酸激酶
miR-103	412(JQ692318)	SDHB(NM_001040483.1)	琥珀酸脱氢酶复合体亚基 B
let7	216(JQ692317)	线粒体(GU295658.1)	NADH 脱氢酶亚基 5、NADH 脱氢酶亚基 6
	352(JQ692326)	UBAP2L(NM_001103107.1)	类泛素关联蛋白 2 样

## 4 结 论

试验对绒山羊骨骼肌中 7 个 miRNA 的表达量及其靶基因进行分析,揭示了肌肉发育相关 miRNA 与脂肪发育相关 miRNA 之间的异同,为绒山羊骨骼肌中 miRNA 的研究提供了试验基础,有利于绒山羊肉质基因的开发研究。

## 参考文献:

[1] WANG X H, TANG S, LE S Y, et al. Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive MicroRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth[J]. *PLoS One*, 2008, 3(7): e2557.

[2] HARFE B D, MCMANUS M T, MANSFIELD J H, et al. The RNaseIII enzyme Dicer is required for morphogenesis but not patterning of the vertebrate limb[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(31): 10898-10903.

[3] McDANELD T G. MicroRNA: Mechanism of gene regulation and application to livestock[J]. *J Anim Sci*, 2009, 87: E21-E28.

[4] 黄志清,陈小玲,余冰,等. miRNA 在骨骼肌发育中的功能及其表达的营养调控[J]. *动物营养学报*, 2011, 23(10): 1647-1650.

[5] 张勇,朱大海. 非编码 RNA 在骨骼肌发育中的功能[J]. *生命科学*, 2010, 22(7): 668-673.

[6] HINSKE L C, PEDRO A F, WINSTON P K, et al. A potential role for intragenic miRNAs on their hosts' interactome [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 533.

[7] 姜怀志,李莫南,马宁. 中国山羊肉生产的研究[J]. *吉林农业大学学报*, 2000, 22(3): 92-95, 103.

[8] McDANELD T G, SMITHE P L, DOUMIT M E, et al. MicroRNA transcriptome profiles during swine skeletal muscle development [J]. *BMC Genomics*, 2009, 10: 77.

[9] HUBERT H, THOMAS R B, ALEXANDER S, et al. Molecular processes during fat cell development revealed by gene expression profiling and functional annotation[J]. *Genome Biol*, 2005, 6: R108.

[10] PILAR P, FRANCISCA S, ANDREU P, et al. Expression of adipose microRNAs is sensitive to dietary

- conjugated linoleic acid treatment in mice[J]. *PLoS One*, 2008, 5(9): e13005.
- [11] LISETTE J A K, KEREN B, TONY V, et al. Genetic architecture of gene expression in ovine skeletal muscle[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12:607.
- [12] 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.
- [13] SUN Q, ZHANG Y, YANG G, et al. Transforming growth factor- $\beta$ -regulated miR-24 promotes skeletal muscle differentiation[J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(8): 2690-2699.
- [14] REDDY A M, ZHENG Y, GURU J, et al. Cloning, characterization and expression analysis of porcine microRNAs[J]. *BMC Genomics*, 2009, 10:65.
- [15] ESAU C, KANG X L, PETALTA E, et al. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation [J]. *J Biol Chem*, 2004, 50: 52361-52365.
- [16] XIE H M, LIM B, LODISH H F. MicroRNAs induced during adipogenesis that accelerate fat cell development are downregulated in obesity[J]. *Diabetes*, 2009, 58: 1050-1057.
- [17] KLOOSTERMAN W P, PLASTERK R H A. The diverse functions of MicroRNAs in animal development and disease[J]. *Dev Cell*, 2006, 10: 441-450.
- [18] 王 虹, 滕鸿琦, 施珏平, 等. let-7 microRNA 调控动物器官发育的研究进展[J]. *生命科学*, 2011, 23(4): 364-368.
- [19] 张莺莺, 管林森, 王洪宝. 利用基因芯片技术筛选秦川牛公牛与阉牛肌肉组织差异表达基因[J]. *遗传*, 2010, 32(11):1166-1174.
- [20] 张 菁, 邹淑雪, 张茂林, 等. miR-15a 靶基因的预测及生物信息学分析[J]. *生物技术通讯*, 2010, 21(2): 179-183.
- [21] MUKAI T, ARAI Y, YATSUKI H, et al. Human aldolase A gene. An additional promoter functions in the human aldolase A gene, but not in rat[J]. *Eur J Biochem*, 1991, 195(3): 781-787.
- [22] 苏强强, 吴登俊. 绵羊 CS-1 基因的克隆及在凉山半细毛羊不同组织中的表达[J]. *畜牧兽医学报*, 2011, 42(11): 1532-1536.

(编辑 郭云雁)