

牦牛卵巢小 RNA 高通量测序及生物信息学分析

熊显荣¹, 兰道亮^{1,2}, 李 键^{1,2*}, 字向东¹, 林亚秋¹, 马 力¹

(1. 西南民族大学生命科学与技术学院, 成都 610041; 2. 西南民族大学青藏高原研究院, 成都 610041)

摘 要: 本研究旨在利用高通量测序技术描绘牦牛卵巢 sRNA 图谱, 为探析牦牛繁殖性能提供基础。以牦牛卵巢组织作为研究对象, 构建牦牛 sRNA 文库, 进行高通量测序和生物信息学分析, 最后利用 RT-qPCR 技术验证 miRNA 在牦牛卵巢组织中的表达。经测序后得到包含 12 126 208 条 clean reads, 其中特异序列为 212 757 条; 比对分析显示, 只有 7 383 536 (60.89%) 条总序列及 80 981 (38.06%) 条特异序列能与牦牛基因组匹配。与黄牛相比, 牦牛 sRNA 中有 56 个表达量上调, 其中 miR-135a 表达上调最显著; 有 33 个表达下调, 其中 miR-2316 表达下调最显著。RT-qPCR 验证 6 个 miRNA 在牦牛卵巢组织中的表达情况, 定量结果和测序结果基本一致。与牦牛 EST 序列信息比对后共预测出 5 个新 miRNA。本研究成功绘制牦牛卵巢 sRNA 图谱, 同时证实 RNA-Seq 高通量测序技术在完善 sRNA 信息及挖掘新 miRNA 方面的优势, 对研究 sRNA 在牦牛遗传育种以及以牦牛为重要高原动物模型来进行高原适应性和抗逆性等相关领域的研究具有重要意义。

关键词: 牦牛; 卵巢; 高通量测序; 小 RNA; 生物信息学

中图分类号: S823.8⁺5.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2016)01-0055-09

Solexa Sequencing of Small RNAs in Yak (*Bos grunniens*) Ovaries and Bioinformatics Analysis

XIONG Xian-rong¹, LAN Dao-liang^{1,2}, LI Jian^{1,2*}, ZI Xiang-dong¹, LIN Ya-qiu¹, MA Li¹

(1. College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China; 2. Institute of Qinghai-Tibetan Plateau Research, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China)

Abstract: The small RNA transcriptome profile of yak ovary was described by Solexa deep sequencing, and provided the basic data for future study on yak breeding performance. In this study, yak ovaries were used for building small RNAs library, and then Solexa sequencing and bioinformatics were applied to analysis. Meanwhile, the expression of selected miRNAs was validated by RT-qPCR. After Solexa sequencing, a total of 12 126 208 clean reads were obtained from the ovary library, which contained 212 757 distinct sequences. Alignment analysis showed that 7 383 536 (60.89%) of total sequences and 80 981 (38.06%) distinct sequences were mapped to the yak reference genome. The results of differential expression analysis showed that 56 small RNAs were up-regulated and 33 small RNAs were down-regulated in yak ovary compared to the cattle counterparts. Among these RNA, miR-135a and miR-2316 had the largest fold-change. The expression of 6 selected miRNAs in yak ovary tissues obtained by RT-qPCR was consistent with the Solexa sequencing results. Furthermore, 5 novel small RNAs were predicted after compared to the yak EST sequence information. All above suggested the small RNAs transcriptome profile of yak ovary was successfully described, and our results confirmed that Solexa sequencing technology has a great advantage in facilitating small RNA information and mining new miRNAs, and provide valu-

收稿日期: 2015-04-21

基金项目: 四川省科技支撑计划(2014NZ0114); 西南民族大学牦牛创新团队(13CXTD01)

作者简介: 熊显荣(1984-), 男, 江西赣州人, 硕士, 主要从事牦牛细胞生物学和发育生物学研究, E-mail: xianrongxiong@163.com

* 通信作者: 李 键, 教授, 主要从事牦牛细胞生物学和发育生物学研究, E-mail: jianli_1967@163.com

able small RNA data for further facilitate the yak genetic breeding and study the adaptation and resistance to high altitude and other related fields of highland animal.

Key words: yak; ovary; Solexa sequencing; small RNA; bioinformatics

牦牛被称作高原之舟,主要分布在中国青藏高原及其毗邻的高山、亚高山地区。在长期的自然选择和人工选择的共同作用下,牦牛对高海拔、低温、低氧牧区具有良好适应性,能充分利用高寒草场资源。牦牛是当地牧民赖以生存和发展的生产、生活资料,也是牧区经济的支柱产业和牧民经济收入的主要来源^[1]。但与普通牛种相比,牦牛生长速度慢、性成熟较晚,而且繁殖性能低,成为高原畜牧业发展及生态保护的主要瓶颈之一。近期牦牛基因组的测序工作基本完成^[2],为下一步开展保护牦牛遗传资源、提高牦牛生产性能、研究牦牛生长发育及探析繁殖性能等诸多方面工作提供可靠的依据。

小分子 RNA (Small RNA, sRNA) 是一类长 20~30 核苷酸 (Nucleotide, nt) 的非编码 RNA 分子。sRNA 最初在秀丽线虫中发现,且广泛存在于真核生物中,是重要的转录后调控因子^[3-4]。大量研究表明小 RNA 具有广泛的生物学功能,对个体发育调控、细胞分化、胚胎发育等生物过程起重要作用^[5-6]。sRNA 主要是通过抑制靶基因翻译或者是直接降解靶基因 mRNA 达到调控基因表达,由此可知 sRNA 对大多数的靶基因都是起负调控作用。鉴于 sRNA 的生物学重要性,准确鉴定其序列及表达时空性是当务之急。然而 sRNA 序列短、同源性高,因此利用传统的克隆法、基因芯片技术等检测 sRNA 非常困难。此外,sRNA 的数量巨大,相应的工作较复杂、费用高、效率低等;再次假阳性高、灵敏度低、速度慢,难以发现低表达量和低拷贝的新 sRNA。随着测序技术的快速发展,高通量测序技术相继诞生并逐渐成熟。高通量测序技术不但能够克服以上难题,而且在发现新的 sRNA 上具有显著优势。目前高通量测序技术已经成功的应用于拟南芥^[7]、水稻^[8]、小麦^[9]、黑猩猩^[10]、人^[11]等生物 sRNA 的研究。

目前有关 sRNA 生物学作用的研究不断深入,表明其在动植物生长发育、细胞死亡、细胞分化和应答外界胁迫等方面具有重要功能^[5,12-14],并在生物合成和功能研究方面取得了一定的研究进展^[15],但在高原动植物上的相关报道较少。因此,本研究利用新二代的高通量测序技术,对牦牛卵巢 sRNA 文

库进行测序并做了相关的生物信息学分析,以期反映高通量测序技术在加速高原动物 sRNA 的发现、促进高原动物 sRNA 的功能研究以及提高人们对动物 sRNA 进化的认识等优势。此外,为深入研究 sRNA 在参与调节卵泡生成及排卵过程中所起作用提供基础性工作,对研究 sRNA 在牦牛遗传育种以及以牦牛为重要高原动物模型来进行高原适应性和抗逆性等相关领域的研究具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 样品采集

从四川红原县屠宰场随机选取 5 头年龄、个体、体质基本一致的成年(约 3 周岁)麦洼母牦牛,屠宰后立即采集卵巢,用生理盐水冲洗干净,液氮速冻后,存于-80 °C 备用,用于总 RNA 的提取。用同样的方法,在成都青白江屠宰场选取 5 头健康的成年黄牛(约 3 周岁)的卵巢,作为对照组。

1.2 总 RNA 提取

参照 Invitrogen 公司的 Trizol 法分别提取 5 头牦牛卵巢组织的总 RNA,为保证 RNA 的纯度,向各 RNA 样本中加入适量的 DNase I (Invitrogen, USA),37 °C 孵育 10 min,然后各取 2 μg 混合均匀组成一个 RNA 样品池 (Sample pool)。通过 Nanodrop ND-1000 (LabTech, USA) 检测 RNA 的浓度和质量。

1.3 小 RNA 文库的构建及 Illumina-Solexa 高通量测序

采用 Ambion 公司 SOLiD Small RNA Expression 试剂盒构建牦牛卵巢的 sRNA 文库。首先,sRNA 在连接酶的作用下加 5' 和 3' 接头,然后将其反转录成 cDNA。向 cDNA 中加入适量的 RNase 用于消除未被转录的 RNA。为了获得足够的高质量 cDNA,进行 PCR 扩增得到测序文库。构建好的文库用 2100 Bioanalyzer (Agilent) 和 Nanodrop ND-1000 进行质量和浓度的检测,然后送深圳华大基因公司测序。

1.4 小 RNA 测序数据处理与分析

测序所得的数据 (Raw reads) 经除去接头序列、空读序列以及低质量序列 (Phred quality < 5) 后得

到纯净序列 (Clean reads)。使用 SOAPaligner/SOAP 2.0 软件将序列比对到牦牛基因组,统计 reads 在参考基因组及基因序列上的分布情况及覆盖度,与牦牛基因组至少有 3 次匹配的 reads 作为潜在的 sRNA 及进一步分析。

将 sRNA 序列与 GenBank 数据库及 Sanger 中心的 Rfam 数据库中的 ncRNA (非编码 RNA) 分别进行比对,识别 sRNA 序列中的 rRNA、tRNA、snRNA 等 ncRNA;与 miRNA 数据库(miRBase)中的 miRNA 进行比对,鉴定样品中的已知 miRNA;

通过片段互相比对,确定与重复序列相关的 siRNA;与外显子、内含子的比对鉴定 mRNA 降解片段。按照优先级(rRNA 等>已知 miRNA>重复序列>外显子>内含子),应用 WEGO 程序对这些 sRNA 涉及的主要生物学功能进行 GO 分类注释。将未获得注释的 sRNA 作为潜在的新 miRNA,利用 Mireap 和 miRanda 对这些 sRNA 进行预测,预测其二级结构、酶切位点以及靶基因等,具体分析流程见图 1。通过比对结果统计测序序列的分布情况及频率,同时利用 RPKM 法计算 miRNA 的表达量。

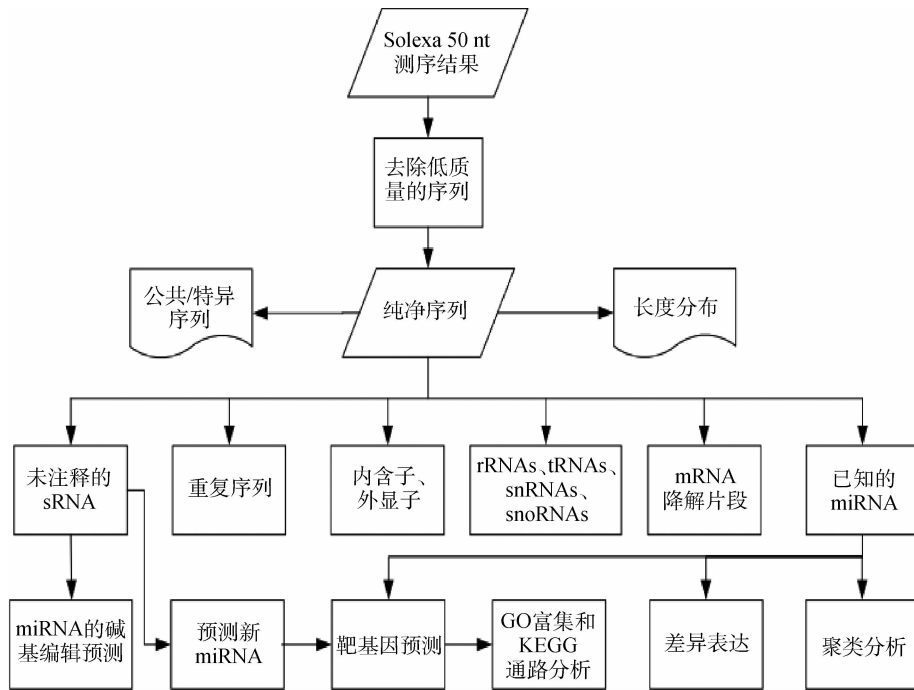


图 1 牦牛 sRNA 数据的分析流程

Fig. 1 Data analysis process of yak sRNA

1.5 小 RNA 表达的验证

采用 RT-qPCR 法对高通量测序部分 sRNA 的表达结果进行验证。利用 Ambion mirVana™ Kit 试剂盒提取总 RNA, RNase-free DNase I 去除基因组 DNA, 然后根据成熟 miRNA 的序列设计引物, 以 18S rRNA 为内参进行 RT-qPCR。采用 Stratagene 公司的高特异性 miRNA RT-qPCR Detection Kit 试剂盒及 CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA)。所有定量 PCR 反应均重复 3 次, 65~95 °C 每隔 0.5 °C 读板 1 次, 绘制熔解曲线。检测结果采用表达量差异 $\Delta\Delta C_t$ 法对目的 sRNA 表达水平进行相对定量分析。

1.6 miRNA 靶位点的预测及其功能分类

通过 miRNA 序列与牦牛已公布 EST 的比对,

预测潜在的 miRNA 靶位点, 具体方法参照文献 [16-17]。预测遵循 miRNA 与靶基因错配不超过 4 个碱基、相邻碱基不错配等原则。然后将预测的所有靶基因进行 GO 注释分析, 预测其可能参与的生物学过程和功能, 进行相应分类及统计。

1.7 统计与分析

所有组别的试验至少重复 3 次, SPSS13.0 进行 ONEWAY ANOVA 检验, 用 SSR 法进行多重比较, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 牦牛小 RNA

为了获得牦牛小 RNA, 构建了牦牛卵巢 sRNA

文库,并用高通量测序技术进行测序。去除接头并滤去低质量数据后,获得长度分布在 16~30 nt 的大量牦牛 sRNA 序列,其中以 22 nt 的序列居多,是由 Dicer 酶途径产生的 sRNA 的典型长度,具有一定的保守性(图 2)。去掉小于 18 nt 的序列后,最

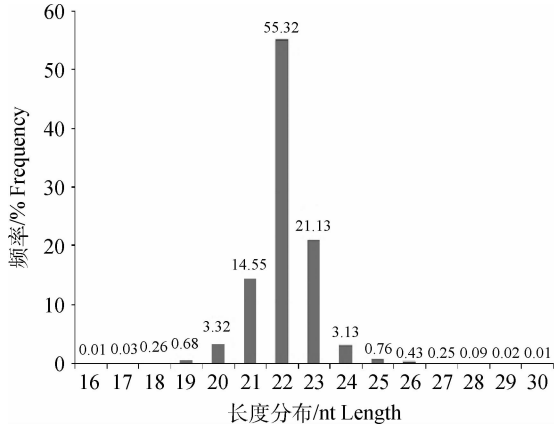


图 2 牦牛小 RNA 长度分布

Fig. 2 Length distributions of unique small RNAs in yak ovary

终获得 12 126 208 条纯净序列(表 1),其中特异序列的数目为 212 757 条。经 SOAP 软件将这些 sRNA 与牦牛、黄牛基因组比对后,其中只有 7 383 536 (60.89%)的总序列及 80 981(38.06%)的特异序列能匹配牦牛基因组。将牦牛 sRNA 与 GenBank、Rfam、miRBase 进行多重比对,最后依次注释(图 3,表 2)。由于牦牛全基因组序列的不够完全,约 69%的 sRNA 序列未能注释。所注释的 sRNA 中,rRNA 最多,占总数的 13.4%,其次是外显子正义(5.8%)、内含子正义(3.23%)、tRNA (3.27%),其余都只占很少一部分。

2.2 miRNA 的分析

为了寻找牦牛卵巢中的已知 miRNA,将牦牛 sRNA 与 miRBase 中的 miRNA 进行比对发现,总共有 9 161 081 条能匹配,其中 5 035 条特异序列与牦牛 miRNA 有同源性(表 2)。表达丰度差异分析后发现,在牦牛 sRNA 中有 56 个 miRNA 表达量比

表 1 黄牛与牦牛小 RNA 测序数据处理及片段长度分布统计

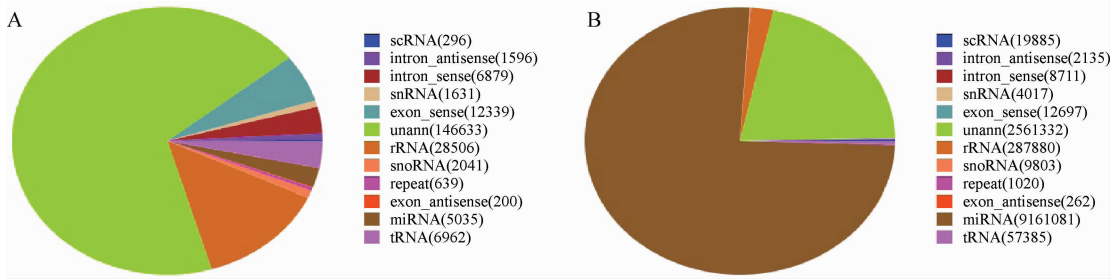
Table 1 Summary of data cleaning and distribution of tags produced by yak and cattle small RNA sequencing

片段类型 Type	黄牛 (%)Cattle	牦牛 (%) Yak
总片段数 Total reads	10 264 742	12 178 609
高质量片段数 High quality	10 244 020(99.80)	12 151 200(99.77)
3'接头 3' adapter	3 074(0.03)	5 100(0.04)
插入片段 Insert	736(0.01)	678(0.01)
5'接头 5' adapter	16 134(0.16)	13 127(0.11)
<18 nt 的片段数 < 18 nt	21 181(0.21)	6 063(0.05)
Poly A	20(0.00)	24(0.00)
纯净序列数 Clean reads	10 202 875(99.40)	12 126 208(99.57)

表 2 牦牛 sRNA 注释结果

Table 2 Annotation of yak small RNAs

分类 Category	特异 sRNA 数 Unique sRNAs	百分比/% Percent	总 sRNA 数 Total sRNAs	百分比/% Percent
总数 Total	212 757	100.00	12 126 208	100.00
外显子(反义)Exon (antisense)	200	0.09	262	0.00
外显子(正义)Exon (sense)	12 339	5.80	12 697	0.10
内含子(反义)Intron (antisense)	1 596	0.75	2 135	0.02
内含子(正义)Intron (antisense)	6 879	3.23	8 711	0.07
miRNA	5 035	2.37	9 161 081	75.55
rRNA	28 506	13.40	287 880	2.37
重复序列 Repeat	639	0.30	1 020	0.01
scRNA	296	0.14	19 885	0.16
snRNA	1 631	0.77	4 017	0.03
snoRNA	2 041	0.96	9 803	0.08
tRNA	6 962	3.27	57 385	0.47
未注释的小 RNA Unann sRNAs	146 633	68.92	2 561 332	21.12



A. Categorization of unique small RNAs in yak; B. Categorization of total small RNAs in yak.

图 3 牦牛小 RNA 的分类

Fig. 3 Categorization of yak small RNAs

黄牛显著上调,有 33 个 miRNA 表达显著下调(图 4)。其中 miR-135a 表达上调极显著($P < 0.01$), miR-2316 表达下调极显著($P < 0.01$)。

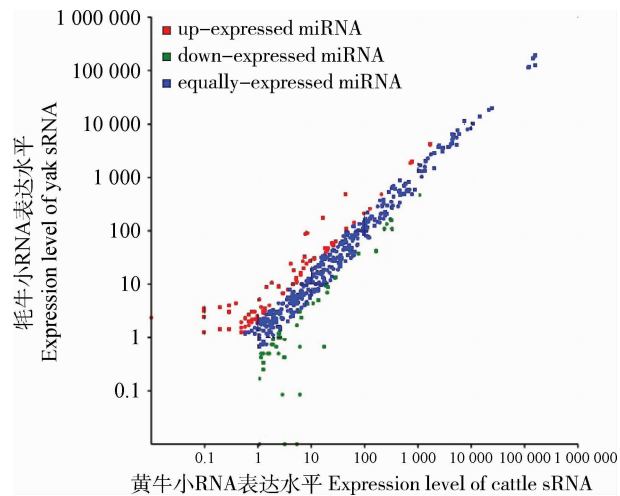


图 4 牦牛与黄牛小 RNA 表达差异

Fig. 4 The differential expression of sRNA between yak and cattle

2.3 新 miRNA 的预测与分析

miRNA 初始转录位点多位于基因间隔区、内含子以及编码序列的反向重复序列上,其前体具有标志性的发夹结构,成熟体的形成是由 Dicer 酶的剪切实现的。利用这一显著特征通过 Mireap 软件来预测新的 miRNA。初步预测结果显示,共发现 27 条候选 miRNA,并且这些候选 miRNA 首位碱基具有一定的偏向性(图 5)。利用牦牛 EST 序列信息进行牦牛新 miRNA 预测,共预测出 5 个 miRNA (依次命名为 new miRNA1、new miRNA2、new miRNA3、new miRNA4 和 new miRNA5),但其表达量都较低(表 3)。

2.4 已知 miRNA 的表达模式

为了进一步验证高通量测序所获得的结果,随

机选择 6 个表达量较高的 miRNA,利用 RT-qPCR 检测其在牦牛卵巢中的表达情况。结果显示与高通量测序结果基本吻合(图 6),由此表明本次高通量测序结果准确性较高,可信度大。

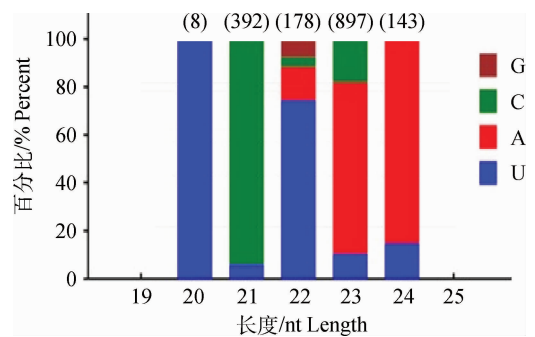


图 5 候选 miRNA 首位碱基偏向性

Fig. 5 miRNA first nucleotide bias

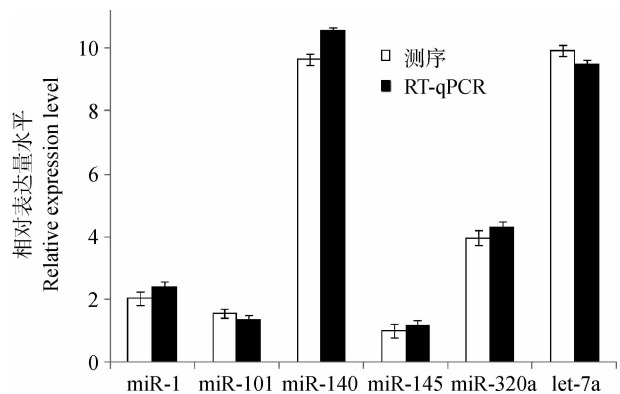


图 6 牦牛卵巢中部分已知 miRNA 的 RT-qPCR 验证

Fig. 6 Validated some miRNAs by RT-qPCR

2.5 miRNA 的潜在靶位点及功能分类

为了进一步深入研究 miRNA 在牦牛卵巢中的生物学功能,通过与已公布的牦牛 EST 序列比对,预测潜在的 miRNA 靶位点。结果显示,已知的保守 miRNA 共预测出 1 403 个潜在靶基因,3 501 个

靶位点。如图 7 所示,这些潜在靶基因涉及较广的生物学过程及功能,涉及生物学过程(Biological processes)、细胞组分(Cellular components)及分子

功能(Molecular functions)3 大类共 47 个小类。由于牦牛 EST 数据的有限,未能对预测出的 5 个新 miRNA 进行潜在靶位点分析。

表 3 利用牦牛 EST 序列预测的新 miRNA

Table 3 The novel miRNAs prediction with yak EST sequences

名称 Name	成熟序列(5'-3') Mature sequence	前体序列 Precursor sequence	表达量 Expression
new miRNA1	TCACGGAGAGGAGAAACTGCGA	TCACGGAGAGGAGAAACTGCGAAA	19
		TCACGGAGAGGAGAAACTGCGA	
		TCACGGAGAGGAGAAACTGCG	
		TCACGGAGAGGAGAAACTGCGAA	
new miRNA2	TGGACAGGCCAAGCCGCTGTGCA	TGGACAGGCCAAGCCGCTGTGC	6
		TGGACAGGCCAAGCCGCTGTGCA	
new miRNA3	TGGGGCACTGGACTACGTGGTC	TGGGGCACTGGACTACGTGGTC	5
		TGGGGCACTGGACTACGTGGTCT	
new miRNA4	TGAGTGTGTGTGTGTGAGAAA	TGAGTGTGTGTGTGTGAGAA	6
		TGAGTGTGTGTGTGTGAGAAA	
		TAGGGTGGTAGAGAAGACAGA	
new miRNA5	TAGGGTGGTAGAGAAGACAGA	TAGGGTGGTAGAGAAGACAGAG	5
		TAGGGTGGTAGAGAAGACAGAGCG	

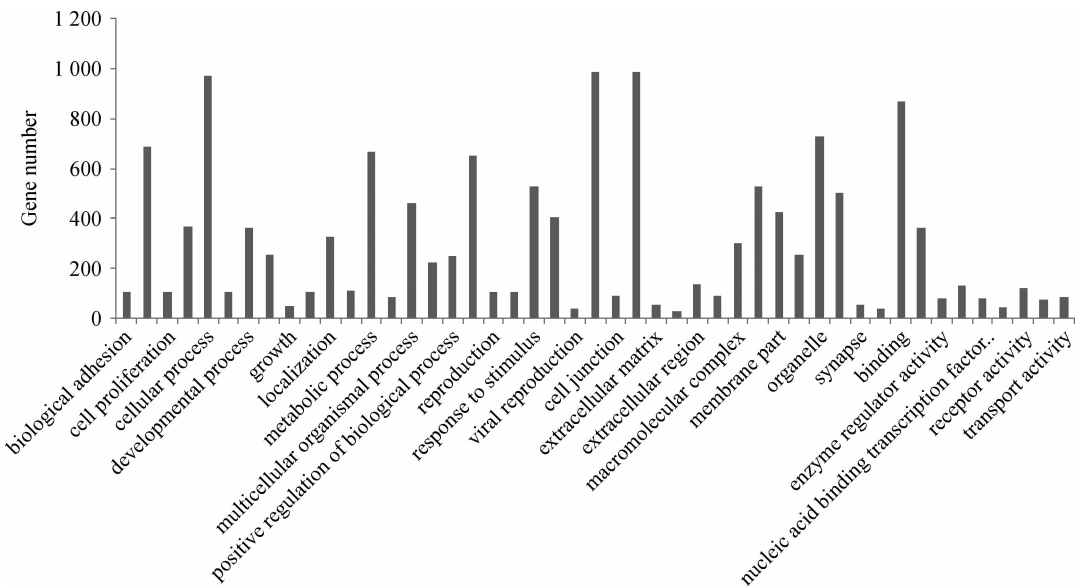


图 7 miRNA 潜在靶基因的生物学功能分类

Fig. 7 Biological function and pathways enriched with predicted and screened miRNA target genes

3 讨论

3.1 牦牛卵巢 sRNA 轮廓及特点

牦牛是青藏高原地区及周边群众赖以生存的重要生产生活资料之一。但其性成熟较晚,且普遍繁殖性能低下,成为长期制约牦牛产业发展的重要问

题。sRNA 介导的转录后基因调控是动植物的一种新型基因调控机制,它在个体发育调控、细胞分化、胚胎发育等生物过程中起着举足轻重的作用。本研究将 5 头牦牛的卵巢样本 RNA 等量混匀,组成了一个牦牛卵巢样本池,通过高通量测序技术一共获得 12 126 208 条纯净序列,其中有 212 757 条特

异序列,由此表明文库构建成功且测序质量良好。这些 sRNA 长度主要集中在 20~23 nt,与 M. M. Hossain 等^[18]研究结果基本一致。与牦牛基因组比对后发现共有 60.89% 的总序列及 38.06% 的特异序列能匹配。经功能注释后发现 miRNA(75.55%) 占总序列数的大部分,但却只占特异序列数的 2.37%,由此表明 miRNA 在牦牛卵巢组织中有较复杂的调控机制。此外未注释的 sRNA 有 21.12% 的总序列及 68.92% 的特异序列,可能是由于牦牛基因组的不够完善。当然,随着牦牛基因组序列信息的不断补充,可以进一步利用其基因组信息进行牦牛 sRNA 的相关研究,这样获得的结果将会更加丰富和完善。

3.2 sRNA 与卵巢的功能

卵巢的滤泡发生和早期胚胎发育需要大量基因表达的协调和信息交流。这些基因的表达需要时空上的精准性,任何的表达改变均会导致卵母细胞和早期胚胎的发育异常。然而 sRNA 介导的调控通路可能是卵巢基因表达精准性的保障。目前研究表明,在哺乳动物卵巢组织中 sRNA 广泛存在。S. Ro 等^[19]在成熟的老鼠卵巢中鉴定出 122 条成熟的 miRNA,认为这些 sRNA 在卵巢的发育以及卵母细胞的成熟过程中起关键作用。此外,T. Mishima 等^[20]也在成年老鼠的卵巢中获得已知 miRNA,且一条新的 miRNA,推测这些 sRNA 与小鼠的繁殖机能存在密切联系。M. M. Hossain 等^[18]在牛的卵巢中发现了 74 条 miRNA,其中有 24 条是新发现的 miRNA。S. K. Tripurani 等^[21]在新生牛胎儿的卵巢中发现 58 条 miRNA,其中有 16 条是首次发现。随着测序技术以及计算机处理技术的快速发展,sRNA 在生殖领域的研究也做得更广泛更深入。H. W. Ahn 等^[22]利用 Illumina Genome Analyzer 在老鼠新生胎儿的卵巢中对 miRNA 进行研究,结果发现 516 条 miRNA,其中有 118 条 miRNA 是首次发现的。此外,C. J. Creighton 等^[23]利用 Illumina GenomeAnalyzer 深度测序技术,从正常和疾病女性生殖器官得到的 103 个组织或者细胞系建立 sRNA 文库,发现了 404 个已知的 miRNA 和 132 个新 miRNA。由此推测,sRNA 在卵巢中有着及其重要的作用。

卵泡的生长与排卵过程的顺利进行与 sRNA 存在密切的联系。F. Tang 等^[24]研究表明,miR 30、miR 16、let 7 和 miR 1792 家簇在卵子发生和早期胚

胎发育过程中的表达模式是动态变化的。let 7 家族的 miRNA 在多种细胞活动包括细胞周期调控都有重要功能,随着卵泡的生长其表达量逐渐增加。张晓东等发现 let 7 家族的多个成员在羊卵巢中均有较高表达^[25]。本研究中,let 7a、let 7b、let 7c、let 7f、let 7g 和 let 7e 在牦牛卵巢中均有较高表达,其中 let 7a 表达量在所有 sRNA 中最高(187 666)。经靶基因预测和 KEGG 通路分析表明,let 7 家族可能与 Wnt、TGF- β 等信号通路有关,从而影响卵泡发育、排卵和激素释放等生殖活动^[26]。目前已经证实 sRNA 与原始卵泡在卵巢内生长发育到成熟排卵也存在一定的联系。D. Tesfaye 等^[27]发现在牛卵母细胞成熟过程中,有 31 个 sRNA 表达下调,28 个表达上调;其中 miR-125、miR-127 等的上调表达对卵泡发育具有重要作用。近年来,研究报道 sRNA 与卵巢病变有关,且 miRNA 已成为卵巢病理诊断的重要手段。M. V. Iorio 等^[28]通过比较分析卵巢的肿瘤组织和正常组织发现,miRNA 在卵巢上皮组织中表达差异显著,其中,卵巢癌组织中过表达的 miRNA 有 miR-200a、miR-141、miR-200c 等,而 miR-199、miR-140 等明显下调。此外,在转录前这些下调的 miRNA 的基因组拷贝数明显低于正常值。经预测发现,这些 miRNA 家簇的靶基因主要调节细胞周期和免疫反应。这就意味着这些 miRNA 家簇的下调导致卵巢肿瘤的生长加速^[29]。卵巢上皮细胞的异常增殖可能是卵巢癌发病的早期征兆。卵巢癌组织中 miRNA-210 和 miRNA-214 显著下调,可能引起 HIF 和 Akt 信号通路的激活而促进肿瘤的生长^[30]。功能早衰的卵巢组织中,miR-202、miR-146a、miR-125b-2、miR-139-3p、miR-654-5p 等都过表达,而 let-7c 和 miR-144 表达却低于正常组织^[28]。本研究中,所采集的卵巢组织均来自成年的空怀期健康牦牛,未发现卵巢异常。然而有关 sRNA 在卵巢发育、卵泡生长、早期胚胎发育及卵巢病变中的功能研究还十分有限,有待进一步深入研究。

3.3 牦牛 sRNA 的验证及新 miRNA 的发现

牦牛卵巢中的 sRNA 与牛、人等的已知 miRNA 具有高度同源性,相似度在 90% 以上,表明牦牛的 miRNA 调控方式可能与其他动物有一定的相似性。其中有些 miRNA 家族表达量特别高,如 let-7、miR140、miR199 及 miR320 等,它们可能在牦牛卵巢中起重要调控作用。为了进一步验证这些 miR-

NA 在牦牛卵巢中的表达,用 RT-qPCR 的方法对测序丰度较高的 6 个 miRNA 进行验证,与测序结果基本一致,说明这些 miRNA 确实存在于牦牛卵巢中且表达量较高。测序结果发现 miR-135a 和 miR-2316 变化极显著。H. W. Ahn 等^[22]报道 miR-135a 在新生小鼠卵巢中也大量表达,推测其在性腺的分化及发育过程中起重要作用。M. M. Hossain 等^[18]也在成年牛的卵巢中获得 miR-2316,推测 miR-2316 与牛的繁殖机能存在密切联系,促使卵子细胞的分裂、胚胎的发育以及调节相关基因的转录。

尽管牦牛基因组序列不够完善,本研究利用数据库中的 EST 信息预测出 5 个新 miRNA。当然这 5 个新预测的 miRNA 有待进一步验证。大部分动物的 miRNA 靶位点分布在编码区的某个互补位置,偶尔在 5' 端的非编码区^[31]。本研究所预测的新 miRNA 的注释功能是参与细胞代谢以及一些生理加工过程,这一结果与之前的研究结果一致^[32],但与植物方面相关报道存在较大差异^[33]。由于牦牛的全基因组以及其 EST 序列信息有限,确定新 miRNA 的潜在靶位点以及其功能存在较大的困难。

4 结 论

本研究应用高通量测序技术对牦牛卵巢进行了 sRNA 测序分析,研究其 sRNA 的表达谱。表达差异分析发现,在牦牛 sRNA 中有 56 个 miRNA 表达量比黄牛显著上调,有 33 个 miRNA 表达显著下调。与牦牛 EST 序列信息共预测出 5 个新 miRNA。这些 miRNA 在牦牛中到底起到何作用,是否在决定牦牛高原适应性及繁殖性能中起调控作用,还需要进一步的验证。

参考文献 (References):

- [1] XIONG X R, LAN D L, LI J, et al. Zebularine and scriptaid significantly improve epigenetic reprogramming of yak fibroblasts and cloning efficiency[J]. *Cell Reprogram*, 2013, 15(4): 293-300.
- [2] QIU Q, ZHANG G J, MA T, et al. The yak genome and adaptation to life at high altitude[J]. *Nat Genet*, 2012, 44(8): 946-949.
- [3] LEE R C, FEINBAUM R L, AMBROS V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* [J]. *Cell*, 1993, 75(5): 843-854.
- [4] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [5] CHEN X M. A microRNA as a translational repressor of *APETALA2* in *Arabidopsis* flower development [J]. *Science*, 2004, 303(5666): 2022-2025.
- [6] PERNAUTE B, SPRUCE T, RODRIGUEZ T A, et al. miRNA-mediated regulation of cell signaling and homeostasis in the early mouse embryo[J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(4): 584-591.
- [7] LU C, TEJ S S, LUO S J, et al. Elucidation of the small RNA component of the transcriptome[J]. *Science*, 2005, 309 (5740): 1567-1569.
- [8] SUNKER R, ZHOU X F, ZHENG Y, et al. Identification of novel and candidate miRNAs in rice by high throughput sequencing[J]. *BMC Plant Biol*, 2008, 8: 25.
- [9] YAO Y, GUO G, NI Z, et al. Cloning and characterization of microRNAs from wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Genome Biol*, 2007, 8(6): R96.
- [10] BEREZIKOV E, TETERING G V, VERHEUL M, et al. Many novel mammalian microRNA candidates identified by extensive cloning and RAKE analysis [J]. *Genome Res*, 2006, 16(10): 1289-1298.
- [11] MORIN R D, O'CONNOR M D, GRIFFITH M, et al. Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells[J]. *Genome Res*, 2008, 18(4): 610-621.
- [12] HUANG A Y, WANG G C, HE L W, et al. Characterization of small RNAs from *Ulva prolifera* by high-throughput sequencing and bioinformatics analysis[J]. *Chinese Sci Bul*, 2011, 56(27): 2916-2921.
- [13] BAEHRECKE E H. miRNAs: micro managers of programmed cell death [J]. *Curr Biol*, 2003, 13 (12): R473-475.
- [14] HOUBAVIY H B, MURRAY M F, SHARP P A. Embryonic stem cell-specific microRNAs [J]. *Dev Cell*, 2003, 5(2): 351-358.
- [15] SUBRAMANIAN S, FU Y, SUNKAR R, et al. Novel and nodulation-regulated microRNAs in soybean roots[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 160.
- [16] ALLEN E, XIE Z X, GUSTAFSON A M, et al. microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants[J]. *Cell*, 2005, 121(2): 207-221.
- [17] SCHWAB R, PALATNIK J F, RIESTER M, et al. Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome[J]. *Dev Cell*, 2005, 8(4): 517-527.

- [18] HOSSAIN M M, GHANEM N, HOELKER M, et al. Identification and characterization of miRNAs expressed in the bovine ovary [J]. *BMC Genomics*, 2009, 10:443.
- [19] RO S, SONG R, PARK C, et al. Cloning and expression profiling of small RNAs expressed in the mouse ovary[J]. *RNA*, 2007, 13(12):2366-2380.
- [20] MISHIMA T, TAKIZAWA T, LUO S S, et al. MicroRNA (miRNA) cloning analysis reveals sex differences in miRNA expression profiles between adult mouse testis and ovary[J]. *Reproduction*, 2008, 136(6):811-822.
- [21] TRIPURANI S K, XIAO C D, SALEM M, et al. Cloning and analysis of fetal ovary microRNAs in cattle [J]. *Anim Reprod Sci*, 2010, 120(1-4):16-22.
- [22] AHN H W, MORIN R D, ZHAO H, et al. MicroRNA transcriptome in the newborn mouse ovaries determined by massive parallel sequencing[J]. *Mol Hum Reprod*, 2010, 16(7):463-471.
- [23] CREIGHTON C J, BENHAM A L, ZHU H F, et al. Discovery of novel microRNAs in female reproductive tract using next generation sequencing [J]. *PLoS One*, 2010, 5(3):e9637.
- [24] TANG F, KANEDA M, O'CARROLL D, et al. Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development[J]. *Genes Dev*, 2007, 21(6):644-648.
- [25] ZHANG X D, LING Y H, ZHANG Y H, et al. MicroRNAs in ovaries of goats (*Capra hircus*) identified by solexa sequencing [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(1):146-153.
- [26] SIROTKIN A V, OVCHARENKO D, GROSSMANN R, et al. Identification of microRNAs controlling human ovarian cell steroidogenesis via a genome-scale screen[J]. *J Cell Physiol*, 2009, 219(2):415-420.
- [27] TESFAYE D, WORKU D, RINGS F, et al. Identification and expression profiling of microRNAs during bovine oocyte maturation using heterologous approach[J]. *Mol Reprod Dev*, 2009, 76(7):665-677.
- [28] IORIO M V, VISIONE R, DI LEVA G, et al. MicroRNA signatures in human ovarian cancer[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(18):8699-8707.
- [29] ZHANG L, VOLINIA S, BONOME T, et al. Genomic and epigenetic alterations deregulate microRNA expression in human epithelial ovarian cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(19):7004-7009.
- [30] GIANNAKAKIS A, SANDALTZOPOULOS R, GRESHOCK J, et al. miR-210 links hypoxia with cell cycle regulation and is deleted in human epithelial ovarian cancer[J]. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7(2):255-264.
- [31] GORAVANAHALLY M P, SALEM M, YAO J, et al. Differential gene expression in the bovine corpus luteum during transition from early phase to mid-phase and its potential role in acquisition of luteolytic sensitivity to prostaglandin F2 alpha [J]. *Biol Reprod*, 2009, 80(5):980-988.
- [32] OBERNOSTERER G, MARTINEZ J, ALENIUS M. Locked nucleic acid-based in situ detection of microRNAs in mouse tissue sections[J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(6):1508-1514.
- [33] LIANG C W, ZHANG X W, ZOU J, et al. Identification of miRNA from *Porphyra yezoensis* by high-throughput sequencing and bioinformatics analysis [J]. *PLoS One*, 2010, 5(5):e10698.

(编辑 程金华)