



钟其恩, 岑永杰, 马康, 彭亚楠, 郑思春. novel-m0287-3p 调控斜纹夜蛾中肠蜕皮激素受体的表达 [J]. 环境昆虫学报, 2023, 45 (4): 988–996.

novel-m0287-3p 调控斜纹夜蛾中肠蜕皮激素受体的表达

钟其恩, 岑永杰, 马康, 彭亚楠, 郑思春*

(华南师范大学生命科学学院昆虫科学与技术研究所, 广州市昆虫发育调控与应用研究重点实验室, 广州 510631;
梅州市华师昆虫发育生物学与应用技术重点实验室广梅园研发中心, 广东梅州 514779)

摘要: microRNA (miRNA) 是一类长度约为 23 个核苷酸的非编码内源性小分子 RNA, 参与真核生物基因表达的调控, 从而在生物发育和应对环境中起着重要的作用。为了探讨 novel miRNA 在害虫发育中的作用, 本研究对斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* miRNA 数据库中表达量较高的 novel-m0287-3p 进行了研究。通过生物信息学分析, 确定了 novel-m0287-3p 是一个新的 miRNA, 并预测其可能靶向蜕皮激素受体 *EcRb1*, 表明 novel-m0287-3p 可能参与斜纹夜蛾发育的调控。双荧光素酶实验表明, novel-m0287-3p 分别结合于 *EcRb1* 3'非编码区的 2 个位点上。实时荧光 PCR 结果显示 novel-m0287-3p 和 *EcRb1* 均在斜纹夜蛾的中肠中表达。为了进一步揭示 novel-m0287-3p 对 *EcRb1* 表达的调控以及对幼虫发育的影响, 本研究进行了体内实验。将 novel-m0287-3p 的模拟体类似物注射入斜纹夜蛾幼虫, 结果显示斜纹夜蛾体内 *EcRb1* 的 mRNA 水平发生了下调, 证明 novel-m0287-3p 能够抑制幼虫 *EcRb1* 的表达。向 4 龄第 1 天的斜纹夜蛾幼虫注射 novel-m0287-3p 后, 幼虫的生长受到抑制; 而注射斜纹夜蛾 6 龄幼虫则导致其化蛹滞后。研究结果表明, novel-m0287-3p 可通过调控蜕皮激素受体 *EcRb1* 的表达, 从而影响斜纹夜蛾的生长发育。

关键词: 斜纹夜蛾; novel-m0287-3p; 生长发育; 蜕皮激素受体

中图分类号: Q968.1; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2023) 04-0988-09

novel-m0287-3p regulates the expression of ecdysone receptor in the midgut of *Spodoptera litura*

ZHONG Qi-En, CEN Yong-Jie, MA Kang, PENG Ya-Nan, ZHENG Si-Chun* (Guangdong Provincial Key Laboratory of Insect Developmental Biology and Applied Technology, Institute of Insect Science and Technology, School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China; Guangmeiyuan R&D Center, Guangdong Provincial Key Laboratory of Insect Developmental Biology and Applied Technology, South China Normal University, Meizhou 514779, China)

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) are a class of non-coding endogenous small RNAs with about 23 nucleotides in length, and are involved in the regulation of eukaryotic gene expression and play an important role in biological development and response to environment. In order to explore the role of novel miRNAs in pest development, the novel-m0287-3p with high expression in the *Spodoptera litura* miRNA database was studied in this study. By bioinformatics analysis, novel-m0287-3p was identified as a novel miRNA, and it was predicted that it might target to ecdysone receptor *EcRb1*, indicating that novel-m0287-3p

基金项目: 国家自然科学基金 (31672362, 32070493)

作者简介: 钟其恩, 男, 硕士研究生, 研究方向为昆虫分子生物学, E-mail: 1462403840@qq.com

* 通讯作者 Author for correspondence: 郑思春, 女, 教授, 研究方向为农业害虫防治的昆虫分子生物学, E-mail: sczheng@senu.edu.cn

收稿日期 Received: 2022-04-12; 接受日期 Accepted: 2022-06-10

may be involved in the developmental regulation of *S. litura*. Dual-luciferase activity assay showed that novel-m0287-3p bound to two sites in the 3' non-coding region of *EcRb1*. Real-time PCR results showed that both novel-m0287-3p and *EcRb1* were expressed in the midgut of *S. litura*. To further verify the regulation of novel-m0287-3p on *EcRb1* expression and its effect on larval development, *in vivo* experiments were performed. novel-m0287-3p agomir was injected into *S. litura* larvae, and the results showed that the mRNA level of *EcRb1* in *S. litura* was down-regulated, which proved that novel-m0287-3p could inhibit the expression of *EcRb1* in larvae. The growth of *S. litura* was inhibited after injection of novel-m0287-3p into one-day-old 4th instar larvae, and the pupation was delayed when the 6th instar larvae were injected with novel-m0287-3p agomir. The results revealed that novel-m0287-3p could affect the growth and development of *S. litura* by regulating the expression of ecdysteroid receptor *EcRb1*.

Key words: *Spodoptera litura*; novel-m0287-3p; growth and development; ecdysone receptor

1993 年, Ambros 和 Lee 等人在线虫 *Caenorhabditis elegans* 中发现了第一个 miRNA (*lin-4*), 它通过调控胚胎后期的发育基因 *lin-14* 从而调控了线虫幼虫从 L1 期到 L2 期的转换。在此后的一年中, 又相继发现了 100 多个有关人类细胞、果蝇 *drosophilid* 以及线虫的非编码小分子 RNA, 掀起了 miRNA 研究的浪潮 (Lee *et al.*, 1993; Reinhart *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2009)。而 miRNA 的生物合成受到严格的调控, 其表达具有组织和时空特异性的特点。一个 miRNA 成熟体的形成主要经历 4 个阶段: miRNA 基因首先在 RNA 聚合酶 II 的作用下形成约为 1 000 bp 左右的初级转录产物 pri-miRNA, 该产物具有帽子结构和 Poly A 尾巴, 二级结构呈发卡结构 (Cullen, 2004; Lee *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005)。接着 pri-miRNA 在 Drosha 酶作用下, 形成具有 70 bp 左右不完全互补配对的茎环结构的 miRNA 前体 (pre-miRNA) (Lund *et al.*, 2004; Lucas and Raikhel, 2013)。细胞核内的 pre-miRNA 经转运蛋白复合物运送到细胞质后, 由 Dicer 酶识别并剪切形成长度 22 bp 左右的双链 miRNA。双链 miRNA 分子中较稳定的一条链通过与基因沉默复合体 RISC 结合, 最终组装成与靶基因结合的 miRNP 复合物 (Martinez *et al.*, 2002; Yi *et al.*, 2003; Miska *et al.*, 2005; Bartel, 2009; Marco *et al.*, 2010)。

在生物体内, miRNA 与靶基因之间的关系并非简单的专一关系, 靶基因和 miRNA 相互结合的位点可以是单个也可以是多个, 两者的调控关系复杂且精密 (Shen *et al.*, 2008; Forman *et al.*, 2008; Duursma *et al.*, 2008; Brodersen and Voinnet, 2009; Shin *et al.*, 2010)。研究表明, miRNA 5'端

可以通过完全和不完整的配对方式, 结合到靶基因 mRNA 的非编码区 (UTR) 或者编码区 (CDS), 从而发挥其对基因调控的功能 (Wightman *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1993; Lytle *et al.*, 2007; Orom *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2008)。一般认为, 当以完全互补配对的形式结合时, miRNA 通过降解 mRNA 而下调靶基因的表达; 当以不完全互补配对的形式结合时, miRNA 则通过抑制 mRNA 翻译而抑制基因表达 (Buchan and Parker, 2007; Lelandais *et al.*, 2010)。此外, miRNA 调控基因表达的方式可以是正调控或负调控, 在不同的细胞周期, 这种调控具有不同的效应。如在 G1/G0 阻滞期, miRNA 启动基因的表达; 而在细胞分裂期, 它们抑制基因的表达。miRNA 的这种激活和抑制效应在细胞周期中可持续切换 (Vasudevan and Steitz, 2007; Vasudevan *et al.*, 2007; Orom *et al.*, 2008)。

昆虫的生长与发育主要受到蜕皮激素和保幼激素两大激素的协同调控, miRNA 也参与了这些重要的生命过程的调控。在果蝇的幼虫末期和预蛹期, 体内高滴度的蜕皮激素诱导 *let-7*、miR-100 和 miR-125 的表达, 同时抑制 miR-34 的表达, 而保幼激素的作用则刚好相反 (Bashirullah *et al.*, 2003; Sempere *et al.*, 2003)。另一方面, 蜕皮激素能够通过抑制 miR-14 的表达而增强其信号强度, 更有利于调控变态发育 (Varghese and Cohen, 2007)。在家蚕 *Bombyx mori* 中, miR-281 能够抑制蜕皮激素受体 B 构型的表达, 所以 miR-281 在幼虫蜕皮阶段时期维持在一个较高的水平; 而在家蚕化蛹阶段, 受蜕皮激素的影响, miR-281 表达量降低 (Jiang *et al.*, 2013)。在斜纹夜蛾中, miR-14-3p 通过靶向蜕皮激素级联基因 *ECR* 和 *E75* 而参

与调控蜕皮激素信号通路 (Luo *et al.*, 2020)。然而, 未见有 novel miRNA 参与调控蜕皮激素信号通路的报道。

基于 miRNA 在调控昆虫的生命过程中的重要作用, 实验室对斜纹夜蛾幼虫中肠和头部组织的 miRNA 进行了深度测序与建库, 总共发现了 530 个 miRNA, 其中包含了 413 个新的 miRNA, 占总数的 77.92% (Zou *et al.*, 2020)。为了进一步研究这些大量的 novel miRNA 在斜纹夜蛾体内的功能与调控机制, 选择其中一个表达量较高的 novel-m0287-3p 作为研究对象, 并利用生物信息学与分子生物学实验相结合的方法进行相关研究。结果表明, novel-m0287-3p 在斜纹夜蛾体内通过调控蜕皮激素受体而影响发育, 可能是潜在的防治害虫的核酸分子, 具有重要的应用价值。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 供试昆虫

实验所用的斜纹夜蛾幼虫和 Spli-221 细胞株来自中山大学昆虫研究所。斜纹夜蛾幼虫在温度 $27 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相对湿度 $70\% \pm 5\%$ 和光周期 12 h 光照:12 h 黑暗条件下, 采用人工饲料饲养。而 Spli-221 细胞株在含有 10% 胎牛血清 (FBS) 昆虫培养基 (SF-900 III SFM, GIBCO, Invitrogen, USA) 中于 28°C 恒温培养, 每隔 2~3 d 观察细胞生长状况, 并以 1:3 的比例稀释培养基后传代培养。

1.1.2 实验主要试剂

Taq 酶/Ex-Taq DNA 聚合酶、DNA 限制性内切酶、T4 连接酶、pMD18-T 载体、dNTP、RT-PCR 试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒均购自 TaKaRa 公司 (中国); 质粒提取试剂盒及 Gel Extraction Kit 分别为美国 Omega 和美国 Axygen 公司的产品; FuGENE[®]HD 转染试剂及荧光素酶的检测试剂盒 Dual Luciferase kit 购自美国 Promega 公司; 用于细胞培养的胎牛血清和优化培养基 Opti-MEM 以及 SF900-III (GIBCO, 美国) 培养基购自 Life 公司 (美国)。novel-m0287-3p mimic 和 novel-m0287-3p agomir (模拟体类似物) 及阴性对照 NC (negative control, 序列为 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU TT-3', 为无义小片段) 均由上海吉玛基因股份有限公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 及蛋白的提取

总 RNA 的提取按照 TaKaRa 公司的 RNA 抽提试剂盒 (Trizol Reagent) 的方法并加以优化。向组织材料中加入 1 mL Trizol Reagent 并充分研磨后于冰上静置 5~10 min, 继而加入氯仿:异戊醇 = 24:1 (V/V) 200 μL , 剧烈震荡 15 s 后冰上放置 10 min, 于 12 000 rpm 和 4°C 离心 20 min。将上层水相转移到新的离心管中, 加入等体积预冷异丙醇, 上下颠倒混匀, -20°C 放置 30 min。再次离心 20 min, 弃上清。加入 600 μL 75% 乙醇上下颠倒洗涤 RNA, 离心 5 min, 弃上清。重复上述洗涤步骤一次。开盖于室温晾干沉淀 15 min, 最后用 DEPC 水溶解 RNA, 保存于 -80°C 。

1.2.2 反转录

根据 TaKaRa 公司的 PrimeScript[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒说明书进行 mRNA 的反转录。miRNA 的反转录采用加尾法, miRNA 首先在 polyA 聚合酶的作用下合成聚腺苷酸尾巴, 再由 oligo-dT 逆转录引物反向合成 cDNA。具体步骤参考 TaKaRa 公司的 Mir-X[™] miRNA First-Strand Synthesis and SYBR[®] qRT-PCR 试剂盒说明书操作。

1.2.3 实时荧光定量 PCR (qPCR) 分析

qPCR 实验按照 TaKaRa 公司的 $2 \times$ SYBR[®] Premix EX Taq[™] Kit 试剂盒的说明书进行。当用目的组织 mRNA 的 cDNA 作为 qPCR 模板时, 以斜纹夜蛾核糖体蛋白 49 基因 (ribosomal protein 49 gene, *rp49*) (GenBank 登录号: XM_022963351) 为内参基因。反应条件为: 95°C 预变性 5 min, 1 个循环; 95°C 5 s, 60°C 20 s, 40 个循环; 最后 95°C 60 s; 50°C 30 s; 95°C 30 s, 1 个循环。miRNA 引物设计用 premier 5.0 软件完成, 本研究使用相关 PCR 的引物序列如表 1 所示。

1.2.4 细胞转染及荧光素酶检测

转染前一天, 将 1 mL 密度为 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 的斜纹夜蛾 Spli-221 细胞加入 12 孔板的单孔中, 培养细胞至密度达到 80%~95% 后进行转染。转染时, 每孔用 50 μL Opti-MEM 培养基稀释 1 μg 质粒/0.5 μg 模拟体 (mimics) 和 3 μL 的 FuGENE[®]HD 转染试剂, 充分混匀并于室温放置 10~15 min; 定时收集细胞用于检测。用于构建双荧光素酶检测的 pscheck-2 载体 (Promega, 美国) 内部含有 LUC (萤火虫荧光素酶) 和 RLUC (海肾荧光素酶) 基因, 将斜纹夜蛾 *EcRb1* 3'UTR 的两个靶位

点片段分别构建到海肾荧光素酶基因的 3'UTR 区域后, 将载体分别与 novel-m0287-3p mimics 和 NC

mimics 共转染 Spli-221 细胞, 使用 Promega 公司的 Dual Luciferase kit 试剂盒检测荧光素酶活性。

表 1 本研究所使用的引物
Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequences (5'→3')
<i>SEcRA</i> -149-F	ctcgagCCCTCAGGAGAGAACGCTCATAG
<i>SEcRA</i> -149-R	gcggcgcgaCGGTCACCGAATACGTACGAAAT
<i>SEcRA</i> -real time-F	CCCAAATGGAAAAATAGGTCGT
<i>SEcRA</i> -real time-R	GACGAGACATAGCTCCTCTTGT
<i>SEcRb1</i> -3055-F	ctcgag ATAAGGGCCATTCGGTGT
<i>SEcRb1</i> -3055-R	gcggcgcTAATTTTATCTTGAGGTGTAAGTTTATTCG
<i>SEcRb1</i> -4195-F	ctcgagTTGTTCCGAAGCACTGAGTATTG
<i>SEcRb1</i> -4195-R	gcggcgcATACAGCCATCTGTACTTTCTTAGATGA
novel-m0287-3p U6-F	TGATTTTGTCAAGTATTTCCGA CCTGCGCAAGGATGAC
<i>SEcRb1</i> -real time-F	GCGTGCTCTTCTTACCTGTT
<i>SEcRb1</i> -real time-R	CTATCCACTGTCTTGACTTTCCG
<i>SIRP49</i> -real time-F	CGTGAGCTGGAGATCCTGATGAT
<i>SIRP49</i> -real time-R	CTCTACAATGGTCTTGGCGTTCT

注: F, 上游引物; R, 下游引物; 小写字母序列为酶切位点。Note: F, Sense primer; R, Antisense primer; Lowercase sequences were the restriction sites.

2 结果与分析

2.1 novel-m0287-3p 的鉴定及其靶基因预测与分析

实验室前期通过对斜纹夜蛾幼虫的中肠和头部组织中 miRNA 的测序、建库和分析, 获得了一系列 miRNA 序列 (Zou *et al.*, 2020)。本研究选择了一个含量较高的 novel-m0287-3p 作为研究对象。为了开展其功能研究, 首先确定 novel-m0287-3p 是否是一个新的 miRNA。通过 RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) 分析, 发现 novel-m0287-3p 前体的二级结构符合 miRNA 前体二级结构特征, 具有典型的茎环结构 (图 1-A)。novel-m0287-3p 前体序列为: 5'-AAATGCAAATGTTGAATACATGACAAAATCCTGTAATAGCATACATCATGATTTTGTCAAGTATTTCCGAATTTTATTC-3', novel-m0287-3p 成熟体序列 (5'-TGATTTTGTCAAGTATTTCCGA-3') 位于发夹结构的一个茎区, 长度为 22 bp, 这与已知动物体内

Dicer 酶的加工特征相一致。随后将 novel-m0287-3p 成熟体序列与 miRBase 数据库 (miRBase, <http://www.mirbase.org>) 中已知的 miRNA 进行比对 (图 1-B), 未发现与相似的 miRNA。由此, 可以确定 novel-m0287-3p 为新的 miRNA。

2.2 novel-m0287-3p 对斜纹夜蛾生长发育的影响

为了研究 novel-m0287-3p 对斜纹夜蛾生长发育的影响, 分别选取斜纹夜蛾 4 龄第 1 天以及 6 龄第 3 天生长状况相一致的幼虫进行体腔注射 novel-m0287-3p agomir (模拟体类似物)。每头幼虫注射 10 μ g agomir。与对照组相比, 4 龄第 1 天的幼虫注射 novel-m0287-3p agomir 后, 其体重增长明显减慢, 说明其生长受到抑制 (图 2-A); 而 novel-m0287-3p agomir 处理后的 6 龄幼虫化蛹发生滞后 (图 2-C), 与正常虫相比较, 虫的发育延缓一天进入蛹期。综合以上结果, 推测 novel-m0287-3p 可能参与调控营养代谢, 致使斜纹夜蛾生长缓慢; 也可能直接参与调控蜕皮激素信号通路, 而影响斜纹夜蛾蜕皮及变态发育。

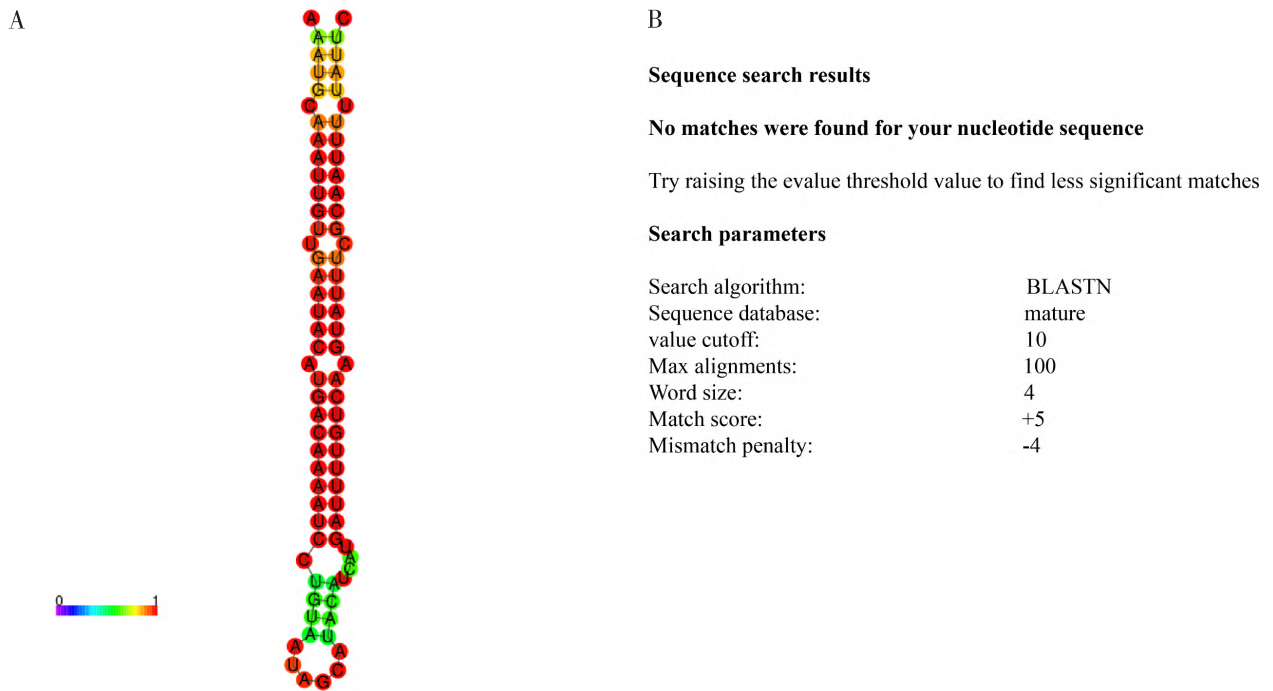


图1 novel-m0287-3p 前体二级结构预测及与 miRBase 数据库比对结果

Fig. 1 Prediction of the secondary structure of novel-m0287-3p precursor and the results of comparison in the miRBase database
 注: A , novel-m0287-3p 前体的二级结构; B , novel-m0287-3p 成熟体序列在 miRBase 数据库中比对的结果。Note: A , Secondary structure of the novel-m0287-3p precursor; B , Results of the novel-m0287-3p mature sequence alignment in the miRBase database.

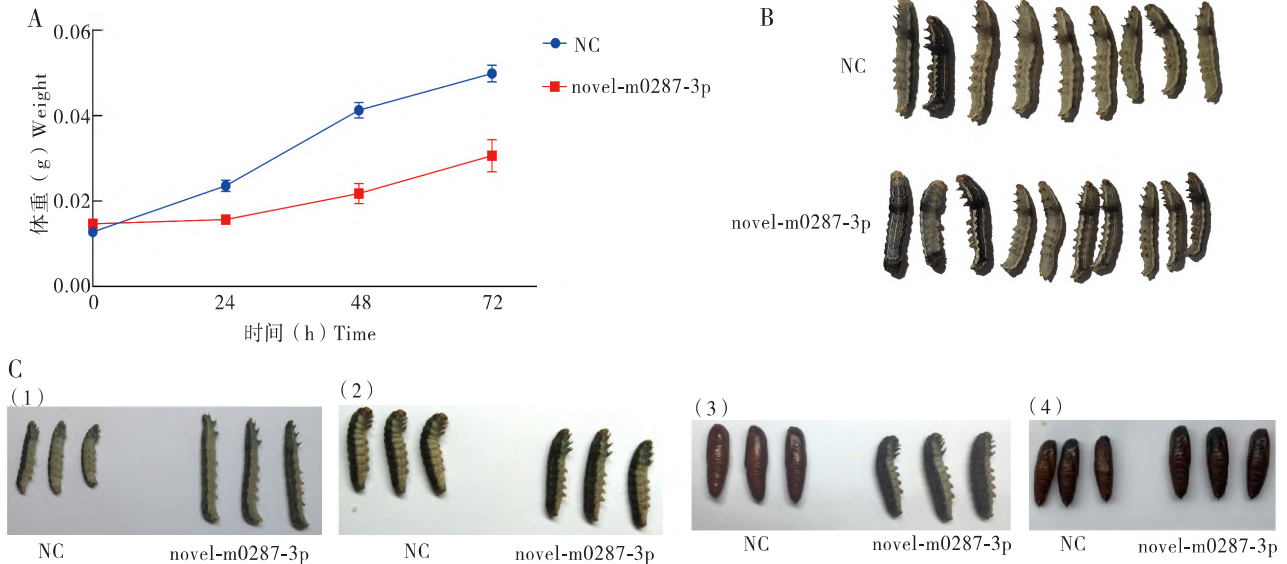


图2 注射 novel-m0287-3p 对斜纹夜蛾 4 龄和 6 龄幼虫发育的影响

Fig. 2 Effects of novel-m0287-3p injection on the development of the 4th instar (A) and the 6th instar (B) of *Spodoptera litura*
 注: A , 注射 novel-m0287-3p 后 4 龄幼虫的体重变化; B , 4 龄幼虫注射 novel-m0287-3p 72 h 后的表型变化; C , 注射 novel-m0287-3p 后对 6 龄幼虫化蛹的影响; (1) , 6 龄第 4 天; (2) , 6 龄第 5 天; (3) , 6 龄第 6 天; (4) , 蛹期; NC , 模拟体的阴性对照; novel-m0287-3p , novel-m0287-3p 模拟体类似物。Note: A , Changes in body weight of 4th instar larvae after injection of novel-m0287-3p; B , Phenotypic changes of 4th instar larvae injected with novel-m0287-3p for 72 h; C , Effects of injection of novel-m0287-3p on pupation of 6th instar larvae; (1) , 6LD4; (2) , 6LD5; (3) , 6LD6; (4) , Pupation; NC , Negative control; novel-m0287-3p , novel-m0287-3p agomir; L , Larval; D , Day.

2.3 预测 *ECR* 是 novel-m0287-3p 的靶基因

由于 novel-m0287-3p 延后了幼虫的蜕皮, 因此分析 novel-m0287-3p 是否可能靶向蜕皮激素信号通路基因。蜕皮激素信号通路中的关键基因蜕皮激素受体存在两种构型 *EcRA* (XM_022963763) 和

EcRb1 (XM_022963759), 并且两种构型的 3'UTR 是一样的 (Luo *et al.*, 2020)。通过 PITA 和 RNAhybrid 两个软件分析发现, novel-m0287-3p 在 *EcRb1* 的 3'UTR 中可能存在两个结合位点, 分别处于 3'UTR 上的 3 055 及 4 195 位点 (图 3-A、B)。

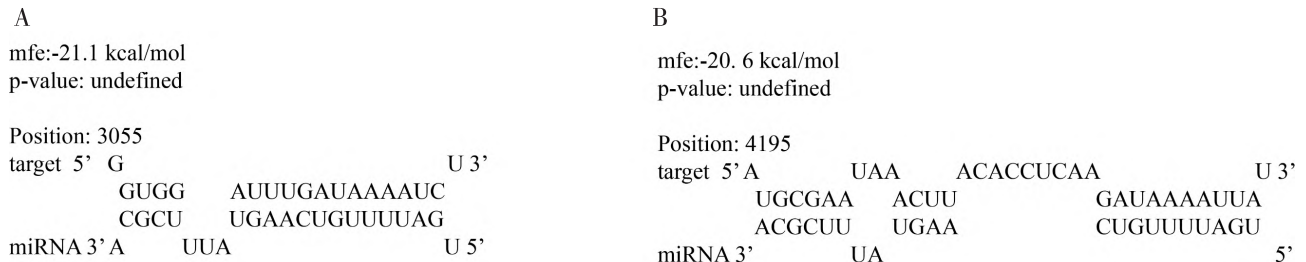


图 3 novel-m0287-3p 在 *EcRb1* 3'UTR 的两个结合位点

Fig. 3 Two binding sites in the *EcR* 3'UTR for novel-m0287-3p

将预测得到的 2 个长度为 100 bp、包含了可能与 novel-m0287-3p 结合位点的 *EcR* 3'UTR 片段克隆到 psi-check2 质粒中, 并与合成的 novel-m0287-3p 模拟物共转染到 Spli-221 细胞中。如果 novel-m0287-3p 能结合到上面预测靶位点, 则 novel-m0287-3p 进入到细胞后, 海肾荧光素酶 mRNA 会被降解或者抑制翻译, 海肾荧光素酶的活性因而降低。结果显示, 与对照组相比, 海肾荧光素酶活性降低 (图 4-A、B), 说明 novel-m0287-3p 能与靶基因 *EcR* 3'UTR 结合, 负调控靶基因 *EcRb1* 的表达。

2.4 novel-m0287-3p 和 *EcRb1* 在中肠中表达

为了进一步研究 novel-m0287-3p 和 *EcR* 在虫体中的关系, 选取龄期最长的 6 龄幼虫作为研究对象, 分别提取 6 龄第 1 天、第 3 天及第 5 天的斜纹夜蛾不同组织 (头部、中肠、脂肪体和表皮) 的总 RNA, 反转录后通过实时荧光定量 PCR 分析两者转录水平, 分别以 snRNA *U6* 和 *rp49* 作为 novel-m0287-3p 和 *EcRA*、*EcRb1* 的内参基因。结果显示, 在斜纹夜蛾 6 龄幼虫的这 3 个时期的组织表达谱中, novel-m0287-3p 都在中肠具有最高的表达量, 而在其他组织几乎无表达, 表明 novel-m0287-3p 主要是在中肠调控相关基因表达 (图 5-A); 相同地, *EcRb1* 在中肠中的表达量也比其他组织高, 而 *EcRA* 在中肠的表达量相对较低, 说明 *EcRb1* 为中肠 *EcR* 的主要表达形式 (图 5-B、C)。表达谱分析的结果暗示两者在斜纹夜蛾中肠可能存在互作关系。

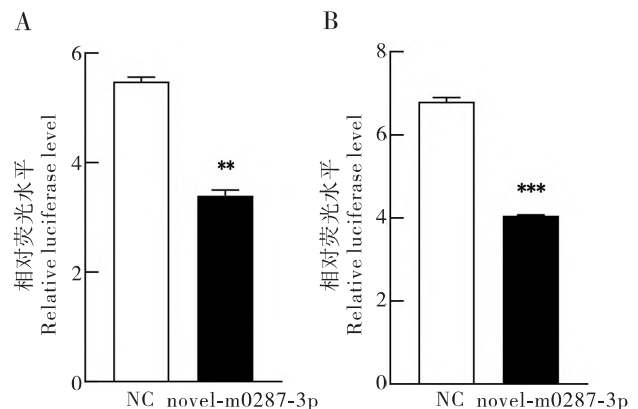


图 4 novel-m0287-3p 作用 *EcR* 3'UTR 的双荧光素酶活性测定

Fig. 4 Determination of dual luciferase activity with the *EcR* 3'UTR regulated by novel-m0287-3p

注: A, novel-m0287-3p 与 *EcR* 3'UTR 上的 3 055 位点作用后的荧光强度; B, novel-m0287-3p 与 *EcR* 3'UTR 上的 4 195 位点作用后的荧光强度; NC, 模拟体类似物的阴性对照; novel-m0287-3p, novel-m0287-3p 模拟体类似物; ** 表示同一处理时间处理组与对照组间差异显著 $P < 0.01$; *** 表示差异极显著 $P < 0.001$, 独立样本 *t* 检验。Note: A, Fluorescence intensity of novel-m0287-3p interacting with site 3 055 on *EcR* 3'UTR; B, Fluorescence intensity of novel-m0287-3p interacting with site 4 195 on *EcR* 3'UTR; NC, Negative control; novel-m0287-3p, novel-m0287-3p mimics; ** showed significantly difference between treatments and control groups by student's *t* test at 0.01 level; *** showed significantly difference between treatments by student's *t* test at 0.001 level.

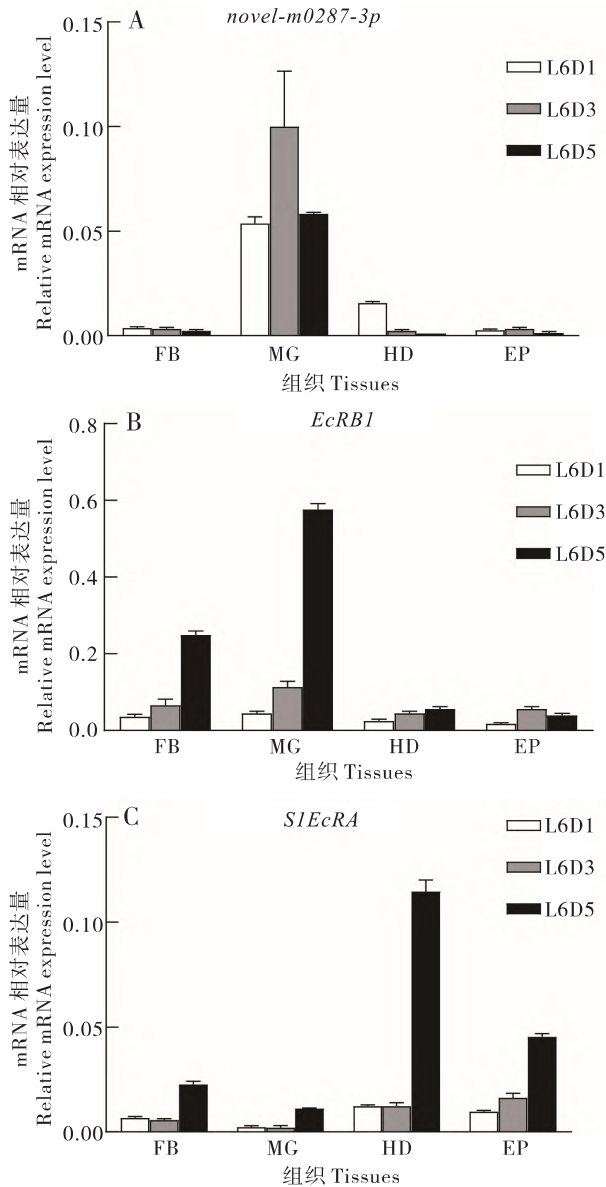


图5 novel-m0287-3p 与 *EcRb1* 在斜纹夜蛾幼虫的不同组织的表达谱分析

Fig. 5 novel-m0287-3p and *EcRb1* expression levels at different tissues of *Spodoptera litura* larvae

注: A, novel-m0287-3p 在各个组织的相对表达量; B, *EcRb1* 在各个组织的相对表达量; C, *EcRA* 在各个组织的相对表达量; L, 幼虫期; D, 天; FB, 脂肪体; MG, 中肠; HD, 头部; EP, 表皮。Note: A, Relative expression of novel-m0287-3p in various tissues; B, Relative expression of *EcRb1* in various tissues; C, Relative expression of *EcRA* in various tissues; L, larva; D, day; FB, Fat body; MG, Midgut; HD, Head; EP, Epidermis.

2.5 novel-m0287-3p 抑制 *EcRb1* 表达

虫体内 novel-m0287-3p 与 *EcRb1* 表达谱的结果暗示了 novel-m0287-3p 可能调控 *EcRb1* 表达。为了

进一步研究两者间的关系, 选取4龄第1天、生长状况一致的斜纹夜蛾幼虫进行体腔注射 novel-m0287-3p, 每头幼虫注射 10 μ g miRNA。注射 novel-m0287-3p 72 h 后检测中肠的 *EcRb1* 表达水平。结果显示, 注射 novel-m0287-3p 后, 斜纹夜蛾中肠 *EcRb1* 的 mRNA 水平发生下调 (图6)。说明 novel-m0287-3p 能够抑制斜纹夜蛾幼虫 *EcRb1* 的表达。

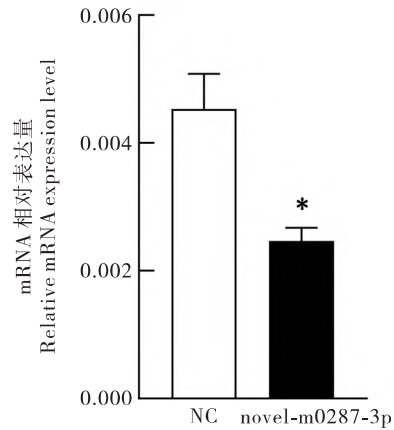


图6 注射 novel-m0287-3p 后斜纹夜蛾中肠的 *EcRb1* 表达水平分析

Fig. 6 Analysis of *EcRb1* mRNA level in the *Spodoptera litura* midgut after novel-m0287-3p injection

注: NC, 模拟体类似物的阴性对照; novel-m0287-3p, novel-m0287-3p 模拟体类似物; * 表示同一处理时间处理组与对照组间差异显著 $P < 0.05$, 独立样本 t 检验。Note: NC, negative control; novel-m0287-3p, novel-m0287-3p mimics; * showed significantly difference between treatments and control groups by student's t test at 0.05 level.

3 结论与讨论

斜纹夜蛾的 miRNA 数据库表明虫体中存在大量 novel miRNA (Zou *et al.*, 2020), 其功能不详。而 miRNA 的鉴定方法主要有 3 种: 克隆构建 cDNA 文库法, 生物信息学预测和高通量测序法。在研究早期为了寻找和鉴定未发现的 miRNA, 主要通过克隆技术构建 cDNA 文库, 基因克隆适合生物体内丰度较高 miRNA 的研究, 而对于那些只在某些特定组织和细胞表达或者表达量低的 miRNA 则不适合 (Chen *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2009)。本研究在实验室前期对斜纹夜蛾幼虫中肠组织的 miRNA 高通量测序的基础上, 选择其中一个本底

表达量比较高的 novel-m0287-3p 进行了序列鉴定和功能研究。通过 RNAfold 分析 novel-m0287-3p 的前体结构,并将其成熟体序列与 miRBase 数据库的 miRNA 比对,确定 novel-m0287-3p 是一个全新的 miRNA (图 1)。

目前,用来进行 miRNA 靶基因预测的生物信息学网站和软件多种多样,但主流的主要有以下几种: TargetScanS、miRanda、PITA、RNAhybrid。尽管每个软件之间的算法不尽相同,但遵循的原理基本一致,大体上分为以下几点: (1) miRNA 与靶基因结合形成二级结构间的热力学稳定性; (2) miRNA 种子区域和靶基因的互补性; (3) 靶基因及其靶位点在同源物种中的保守性; (4) miRNA 与靶基因结合形成二级结构的复杂程度 (Lewis *et al.*, 2004; John, 2004; Krüger and Rehmsmeier, 2006)。本实验使用 PITA 和 RNAhybrid 两个在线软件共同对 novel-m0287-3p 进行靶基因预测,求其交集基因以提高结果的精准度。预测发现 novel-m0287-3p 可能靶向蜕皮激素信号通路基因 *EcRb1* (图 3)。

为了进一步探究 novel-m0287-3p 的功能,本研究通过采用基因沉默技术,用 novel-m0287-3p 模拟体类似物分别注射 4 龄与 6 龄幼虫,皆得到了幼虫生长发育受到抑制的结果 (图 2),并且发现在这些虫中的 *EcRb1* 表达量下降 (图 6)。进一步通过双荧光素酶报告系统证明了 novel-m0287-3p 结合于 *EcRb1* 3'UTR 的两个位点 (图 4)。表明 *EcRb1* 是 novel-m0287-3p 的靶基因之一。蜕皮激素是调控昆虫蜕皮与变态发育的重要因素,其受体 *EcR* 的表达下降将导致昆虫不能正常蜕皮而生长延缓,甚至死亡。因此,本研究证明了 novel-m0287-3p 在调控昆虫发育中的功能,同时也证明了斜纹夜蛾中存在的大量 novel miRNA 是具有功能的。

已有研究表明 miRNA 调控 *EcR* 的表达。在家蚕中,马氏管特异性表达的 miR-281 调控靶标基因 *Bm-EcR* 的表达 (Jiang *et al.*, 2013); 在果蝇中,miR-14 通过靶向基因 *EcR* 而调控蜕皮激素信号通路 (Varghese and Cohen, 2007); 在棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 中,针对靶基因 *Ha-EcR* 设计的人造 miRNA 可以影响棉铃虫的正常生长和产卵量 (Yogindran and Manchikarla, 2016)。本研究的结果表明 novel-m0287-3p 通过结合 3'UTR 而调控 *EcR* 的表达。这些结果表明了不同物种中的 *EcR* 受

不同 miRNA 的调控。由于每个基因有可能受多个 miRNA 的调控,因此,仅 novel-m0287-3p 不能完全抑制 *EcR* 的表达 (图 6),这可能是注射 novel-m0287-3p 不能完全控制斜纹夜蛾蜕皮的原因 (图 2)。同时,通过预测,本研究发现 novel-m0287-3p 可能靶向相关营养代谢通路基因。因此,注射 novel-m0287-3p 后的斜纹夜蛾发育延缓也可能是营养代谢受到影响的缘故,这需要后续实验的进一步验证。

本研究中利用荧光定量 PCR 的方法分析了 novel-m0287-3p 和 *EcRb1* 的时空表达谱 (图 5),发现 novel-m0287-3p 具有中肠特异性表达的特点,表明 novel-m0287-3p 主要是在中肠调控靶基因而发挥作用,可能调控 *EcR* 在中肠的表达量较高的基因 *EcRb1*。两者的时空表达谱以及结合实验表明两者在中肠发生关系,而调控围食膜的发育。通过向斜纹夜蛾幼虫血淋巴注射 novel-m0287-3p agomir 及其阴性对照 NC agomir,并对中肠中 *EcRb1* 的 mRNA 表达量进行检测后发现,与对照相比,注射 novel-m0287-3p 后斜纹夜蛾体内 *EcRb1* 的 mRNA 水平发生下调,说明所注射的 novel-m0287-3p 能够运输至中肠,抑制中肠内 *EcRb1* 的表达。

综上所述,本研究通过表达谱分析、结合实验和敲除实验,证明了 novel-m0287-3p 对斜纹夜蛾中肠 *EcRb1* 表达的调控,从而证明了 novel-m0287-3p 在斜纹夜蛾发育中的功能。

参考文献 (References)

- Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116 (2): 281-297.
- Bashirullah A, Pasquinell AE, Kiger AA, *et al.* Coordinate regulation of small temporal RNAs at the onset of *Drosophila metamorphosis* [J]. *Developmental Biology*, 2003, 259 (1): 1-8.
- Brodersen P, Voinnet O. Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, 10 (2): 141-148.
- Buchan JR, Parker R. The two faces of miRNA [J]. *Science*, 2007, 318 (5858): 1877-1878.
- Chen J, Lozach J, Garcia EW, *et al.* Highly sensitive and specific microRNA expression profiling using BeadArray technology [J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36 (14): e87.
- Chen X. A microRNA as a translational repressor of *APETALA2* in *Arabidopsis* flower development [J]. *Science*, 2004, 303 (5666): 2022-2025.
- Cullen BR. Transcription and processing of human microRNA precursors

- [J]. *Molecular Cell*, 2004, 16 (6): 861–865.
- Duursma AM, Kedde M, Schrier M, et al. MiR-148 targets human *DNMT3b* protein coding region [J]. *RNA*, 2008, 14 (5): 872–877.
- Forman JJ, Legese-Miller A, Collier HA. A search for conserved sequences in coding regions reveals that *let-7* microRNA targets Dicer within its coding sequence [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105 (39): 14879–14884.
- Jiang J, Ge X, Li Z, et al. MicroRNA-281 regulates the expression of ecdysone receptor (*EcR*) isoform B in the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 43 (8): 692–700.
- John B, Enright AJ, Aravin A, et al. Human microRNA targets [J]. *PLoS Biol.*, 2004, 2 (11): e363.
- Krüger J, Rehmsmeier M. RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible [J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34 (Web Server issue): W451–4.
- Lee RC, Feinbaum RL, 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.
- Lee Y, Kim M, Han J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II [J]. *EMBO Journal*, 2004, 23 (20): 4051–4060.
- Lelandais-Brière C, Sorin C, Declerck M, et al. Small RNA diversity in plants and its impact in development [J]. *Curr Genomics*, 2010, 11 (1): 14–23.
- Lewis BP, Shih IH, Jones, et al. Prediction of mammalian microRNA targets [J]. *RNA*, 2004, 10: 1507–1517.
- Lucas K, Raikhel AS. Insect microRNA: Biogenesis, expression profiling and biological functions [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 43 (1): 24–38.
- Lund E, Guttlinger S, Calado A. Nuclear export of microRNA precursors [J]. *Science*, 2004, 303 (5654): 95–98.
- Luo W, Huang LX, Qin SK, et al. Multiple microRNAs control ecdysone signaling in the midgut of *Spodoptera litura* [J]. *Insect Sci.*, 2020, 27 (6): 1208–1223.
- Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5'UTR as in the 3'UTR [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104 (23): 9667–9672.
- Marco A, Hui JH, Ronshaugen M, et al. Functional shifts in insect microRNA evolution [J]. *Genome Biol. Evol.*, 2010, 2: 686–96.
- Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, et al. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi [J]. *Cell*, 2002, 110 (5): 563–74.
- Miska EA. How microRNAs control cell division, differentiation and death [J]. *Curr. Opin. Gen. Dev.*, 2005, 15 (5): 563–568.
- Orom UA, Nielsen FC, Lund AH. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation [J]. *Molecular Cell*, 2008, 30 (4): 460–471.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 2000, 403 (6772): 901–906.
- Sempere LF, Sokol NS, Dubrovsky EB, et al. Temporal regulation of microRNA expression in *Drosophila metamorphosis* by hormonal signals and broad-Complex gene activity [J]. *Developmental Biology*, 2003, 259 (1): 9–18.
- Shen WF, Hu YL, Uttarwar L, et al. MicroRNA-126 regulates *HOXA9* by binding to the homeobox [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2008, 28 (14): 4609–4619.
- Shin C, Nam JW, Farh KK, et al. Expanding the microRNA targeting code: Functional sites with centered pairing [J]. *Molecular Cell*, 2010, 38 (6): 789–802.
- Varghese J, Cohen SM. MicroRNA miR-14 acts to modulate a positive autoregulatory loop controlling steroid hormone signaling in *Drosophila* [J]. *Genes & Development*, 2007, 21 (18): 2277–2282.
- Vasudevan S, Steitz JA. AU-rich-element-mediated up-regulation of translation by FXR1 and Argonaute 2 [J]. *Cell*, 2007, 128 (6): 1105–1118.
- Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation [J]. *Science*, 2007, 318 (5858): 1931–1934.
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-4* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans* [J]. *Cell*, 1993, 75 (5): 855–862.
- Yi R, Qin Y, Macara I, et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs [J]. *Genes Dev.*, 2003, 17 (24): 3011–3016.
- Yogindran S, Rajam MV. Artificial miRNA-mediated silencing of ecdysone receptor (*EcR*) affects larval development and oogenesis in *Helicoverpa armigera* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 77: 21–30.
- Zhou X, Sunkar R, Jin H, et al. Genome-wide identification and analysis of small RNAs originated from natural antisense transcripts in *Oryza sativa* [J]. *Genome Research*, 2009, 19 (1): 70–78.
- Zou XP, Lin YG, Cen YJ, et al. Analyses of microRNAs and transcriptomes in the midgut of *Spodoptera litura* feeding on *Brassica juncea* [J]. *Insect Sci.*, 2021, 28 (2): 533–547.