



刘飞玲, 廖珍, 洪喜雄, 彭睿智, 肖花美, 李飞. 家蚕 Piwi 亚家族基因的克隆、表达及进化分析 [J]. 环境昆虫学报, 2022, 44 (4): 838–849.

# 家蚕 Piwi 亚家族基因的克隆、表达及进化分析

刘飞玲<sup>1,2</sup>, 廖珍<sup>3</sup>, 洪喜雄<sup>1</sup>, 彭睿智<sup>1</sup>, 肖花美<sup>1\*</sup>, 李飞<sup>2</sup>

(1. 宜春学院生命科学与资源环境学院, 江西省作物生长发育调控重点实验室, 江西宜春 336000;

2. 浙江大学昆虫科学研究所, 杭州 310058; 3. 南京农业大学植物保护学院, 南京 210095)

**摘要:** 为克隆家蚕 *Bombyx mori* Piwi 亚家族蛋白基因 cDNA 全长序列, 分析其分子特征和表达模式, 探究 Piwi 亚家族蛋白在家蚕中的生理功能, 本研究利用已知物种的 Piwi 亚家族蛋白搜索家蚕基因组, 预测获得家蚕 Piwi 亚家族蛋白基因 *siwi1* 和 *siwi2*, 采用 RACE 技术克隆 *siwi1* 和 *siwi2* 的全长 cDNA 序列, 利用 ORFfinder、Gene-Explorer、InterPro 等分析其分子特征; 其次, 利用已知的所有物种 Piwi 蛋白及其类似物 Piwil 构建系统发育树; 最后, 通过荧光定量 PCR 技术检测了 *siwi1* 和 *siwi2* 在丝腺、马氏管、中肠、头部、卵巢和精巢以及不同发育时期 (卵、1~5 龄幼虫、蛹、成虫) 的表达水平, 结果显示, 克隆获得了 *siwi1* cDNA 全长 3 277 bp, 包含部分 5'UTR、完整的开放阅读框 ORF 和 3'UTR, 获得了 *siwi2* 的部分序列, 其中 *siwi1* 对应 *BmPiwi*, *siwi2* 对应 *BmAgo3*。系统发育结果显示, 家蚕 Piwi 亚家族蛋白与乳草长蜡 *Oncopeltus fasciatus*、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis*、优雅蝟蠹 *Gampsocleis gratiosa*、斯氏按蚊 *Anopheles stephensi*、褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 的 PIWI 蛋白以及东亚飞蝗 *Locusta migratoria* 的 PIWI2 和 PIWI3 蛋白亲缘关系最近, 和三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus* 的 PIWI2 和 PIWI3 同为一支。家蚕 AGO3 蛋白与小菜蛾 *Plutella xylostella* 的 AGO3 亲缘关系最近, 与西方玉米根虫 *Diabrotica virgifera virgifera*、白蜡窄吉丁 *Agrilus planipennis* 的 AGO3 及东亚飞蝗 *Locusta migratoria* 的 PIWI1 同属一支, 与橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 的 AGO3 同属一总支。组织表达结果表明 *BmPiwi* 在精巢表达水平显著高于其他组织, 其次是卵巢及头部, 而 *BmAgo3* 在头部表达水平显著高于其他组织。*BmPiwi* 和 *BmAgo3* 在卵期表达量最高, 但在初孵幼虫中表达量迅速下降, 并在整个幼虫时期都维持低表达状态, 直至蛹期开始表达量出现大幅回升, 并维持高水平表达至成虫期。本研究发现 *BmPiwi* 和 *BmAgo3* 在家蚕中的表达具有明显的时空特异性, 在生殖组织以及需要进行大量细胞活动的时期, 家蚕 Piwi 亚家族蛋白基因的表达均发生了明显的变化, 为进一步探测家蚕 Piwi 亚家族的生理功能提供了研究方向和理论基础。

关键词: 家蚕; Piwi 亚家族蛋白; 分子克隆; 进化分析; 表达谱

中图分类号: Q963; S89

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2022) 04-0838-12

## Cloning, expression and phylogenetic analysis of Piwi subfamily gene in silkworm

LIU Fei-Ling<sup>1,2</sup>, LIAO Zhen<sup>3</sup>, HONG Xi-Xiong<sup>1</sup>, PENG Rui-Zhi<sup>1</sup>, XIAO Hua-Mei<sup>1\*</sup>, LI Fei<sup>2</sup>

(1. College of Life Sciences and Resource Environment, Key Laboratory of Crop Growth and Development Regulation of Jiangxi Province, Yichun University, Yichun 336000, Jiangxi Province, China; 2. Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 3. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** To explore the physiological function of the Piwi subfamily protein in the silkworm, the full-

基金项目: 国家自然科学基金 (31760514); 江西省自然科学基金青年基金 (20181BAB214012)

作者简介: 刘飞玲, 女, 硕士, 主要从事昆虫分子生物学研究, E-mail: feiling.liu@outlook.com

\* 通讯作者 Author for correspondence: 肖花美, 博士, 副教授, 主要研究方向为昆虫基因组学与生物信息学, E-mail: xiaohuamei625@163.com

收稿日期 Received: 2021-05-17; 接受日期 Accepted: 2021-06-22

length cDNA of *Bombyx mori* Piwi subfamily protein gene was cloned, and the molecular characteristics and expression patterns were analyzed. First, we searched the *B. mori* genome using the Piwi subfamily proteins of known species and obtained the *B. mori* Piwi subfamily protein genes *siwi1* and *siwi2*. The full-length cDNA sequences of *siwi1* and *siwi2* was cloned using RACE technology. Then the molecular characteristics were analyzed using ORFfinder, Gene-Explorer, InterPro etc. Secondly, the phylogenetic tree was constructed using all known species Piwi protein and the analogue Piwil. Finally, the expression levels of *siwi1* and *siwi2* in silk gland, malpighian tubes, midgut, head, ovary and testis were detected by quantitative real-time PCR technology, as well as the expression levels of *siwi1* and *siwi2* at different developmental stages (eggs, 1 ~ 5 instar larvae, pupae, and adult). The full length of *siwi1* was 3 277 bp, containing part of 5'UTR, complete open reading frame (ORF) and 3'UTR, but we just got a partial of *siwi2* with 823 bp, and *siwi1* corresponded to *BmPiwi*, *siwi2* corresponded to *BmAgo3*. Phylogenetic trees showed that the silkworm Piwi subfamily protein was closely related to the PIWI proteins of *Oncopeltus fasciatus*, *Drosophila melanogaster*, *Bactrocera dorsalis*, *Gampsocleis gratiosa*, *Anopheles stephensi*, *Nilaparvata lugens*, as well as the PIWI2 and PIWI3 proteins of *Locusta migratoria*, and was clustered to one clade with PIWI2 and PIWI3 of *Portunus trituberculatus*. The *BmAgo3* protein had the closest relationship with the *Plutella xylostella* AGO3, and clustered to one clade with AGO3 of *Diabrotica virgifera virgifera*, *Agrilus planipennis*, and PIWI1 of *Locusta migratoria*. And clustered to a general clade with AGO3 of *Bactrocera dorsalis*. The expression level of *BmPiwi* in testis was significantly higher than other tissues, followed by ovaries and head, while the expression level of *BmAgo3* in head was significantly higher than other tissues, followed by testes and ovaries. The expression levels of *BmPiwi* and *BmAgo3* were the highest in the egg stage, but the expression level in the newly hatched larvae decreased rapidly and maintained a low expression level state during the whole larval period, until the pupa stage, the expression level raised sharply and maintained a high level expression to the adult stage. The expression of *BmPiwi* and *BmAgo3* in *B. mori* had obvious spatial and temporal specificity. During the period of reproductive tissues and the period of a lot of cell activities, the expression of Piwi subfamily gene in *B. mori* changed a lot. Our research provided research direction and theoretical basis for further detecting the physiological function of the *B. mori* Piwi subfamily.

**Key words:** *Bombyx mori*; Piwi subfamily protein gene; molecular cloning; phylogenetic analysis; expression profile

非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA) 一度被认为在生物体内无功能, 随着研究的深入, 研究人员发现 ncRNA 在生物体内不可或缺, 依据其生物起源、大小、长度和功能等, 可将 ncRNA 分为 microRNAs (miRNAs)、小干扰 RNA (siRNAs)、piwi-RNAs (piRNAs) 等, 广泛参与细胞增殖、分化、发育、繁殖、病毒防御等生理生化过程 (Seto *et al.*, 2007; Ku and Lin, 2014; Ponnusamy *et al.*, 2017; Ozata *et al.*, 2019)。Argonaute 蛋白家族是 RNA 沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC) 的重要组成部分, 在生物体内高度保守 (Carmell *et al.*, 2002; James *et al.*, 2005; Hock *et al.*, 2007), 其组织特异性和定向性决定了不同非编码 RNA 的表达和功能 (Ponnusamy *et al.*,

2017)。依据不同物种间的序列同源性和功能区域, Argonaute 蛋白家族可分为 AGO 亚家族 (与拟南芥 *Arabidopsis thaliana* AGO1 同源)、PIWI 亚家族 (与黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* Piwi 同源) 和 WAGO 亚家族。在细胞质中, AGO 与 miRNA 和 siRNA 相互作用促进转录后基因的沉默 (Valdmanis *et al.*, 2012; Voller *et al.*, 2016)。而 piRNA 3'端甲基化修饰的 2'-氧基团只与 AGO 家族的 PIWI 亚家族相结合, 沉默转录元件 (Cox *et al.*, 1998; Girard *et al.*, 2006; Klenov *et al.*, 2011), 调控基因表达, 在哺乳动物中还可以抑制逆转录转座子的表达 (Ponnusamy *et al.*, 2017)。piRNA 与 PIWI 在细胞质中结合后转移至细胞核 (Saito *et al.*, 2010), 形成的复合体根据定位以及

伴侣蛋白的不同而产生不同的功能 (Ponnusamy *et al.*, 2017), 对于受精 (Ding *et al.*, 2013; Roovers *et al.*, 2015)、维持生殖干细胞自我更新 (Peter *et al.*, 2005; Palakodeti *et al.*, 2008)、胚胎发育 (Mani *et al.*, 2014; Navarro *et al.*, 2015; Roovers *et al.*, 2015)、神经突触可塑性 (Rajasethupathy *et al.*, 2012)、代谢过程 (Jones *et al.*, 2016; Henaoui *et al.*, 2017)、组织修复及再生 (Rinkevich *et al.*, 2010; Rizzo *et al.*, 2014) 等过程具有重要作用。

PIWI 结构域是 Argonaute 蛋白中重要的功能结构域, 位于 Argonaute 蛋白的羧基端, 由 400 ~ 600 个氨基酸残基组成。在哺乳动物 (Aravin *et al.*, 2006; Girard *et al.*, 2006; Grivna *et al.*, 2006; Lau *et al.*, 2006)、线虫 *Caenorhabditis elegans* (Batista *et al.*, 2008; Das *et al.*, 2008)、斑马鱼 *Danio rerio* (Houwing *et al.*, 2007) 和昆虫的性腺 (Saito *et al.*, 2006; Vagin *et al.*, 2006) 中均能检测到 piRNA 和 PIWI, 在哺乳动物的肺、心脏、肝、肾、脑、胰腺、卵巢、精巢中均有 PIWI 的表达 (Seto *et al.*, 2007; Ku and Lin, 2014; Ponnusamy *et al.*, 2017; Ozata *et al.*, 2019)。在细胞质中, PIWI 可以不通过 piRNA 的辅助, 直接与受体或信号分子相互作用, 调控转录后修饰进而调控靶标蛋白的生物功能 (Zhang *et al.*, 2012; Ponnusamy *et al.*, 2017; Sivagurunathan *et al.*, 2017; Tan *et al.*, 2017)。Houwing 等 (2007) 通过原位杂交发现, 斑马鱼中的 Piwi 亚家族成员只在雌性成鱼的生殖细胞中有表达, 在不含有生殖细胞的睾丸中无 Piwi 亚家族的成员的表达。Williams 和 Rubin 等 (2002) 发现黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中 3 个 Piwi 亚家族成员 (Piwi、Aub、Ago3) 也只在生殖细胞中表达, 此外, Saito 等 (2006) 通过 Western blot 等相关实验也同样证明黑腹果蝇中的 3 个 Piwi 亚家族蛋白只在精巢、卵巢和胚胎中表达, 而在 S2 细胞中无表达。

目前对 Piwi 亚家族蛋白的研究主要集中于哺乳动物或模式生物, 如黑腹果蝇、线虫等。昆虫占已知动物种类的 60% 以上, 影响涉及医学、经济、农业等多个领域。但昆虫 Piwi 亚家族基因的生物学研究大多局限于黑腹果蝇 (Lin and Spradling, 1997; Seto *et al.*, 2007; Ewen-Campen *et al.*, 2013; Ku and Lin, 2014; Ponnusamy *et al.*, 2017; Ozata *et al.*, 2019)。本文克隆了家蚕

*Bombyx mori* Piwi 亚家族蛋白基因全长, 并对全长转录本进行了生物信息学分析; 研究了 Piwi 亚家族蛋白基因在家蚕各个发育阶段和组织中的表达情况, 为家蚕 Piwi 亚家族蛋白功能及 piRNA 的研究奠定基础, 为理解家蚕 piRNA 和 Piwi 互作对家蚕生殖调控提供思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试虫源: 家蚕 (品系: 7091) 由中国农业科学院蚕业研究所提供, 在温度  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , 相对湿度 60% ~ 75%, 光周期 16 L:8 D 的条件下采用人工饲料及桑叶交替饲养。人工饲料购自山东省蚕业研究所烟台绿宝蚕用饲料厂。

试剂: RNA 提取试剂 TRIzol<sup>®</sup> Reagent, RACE 反应试剂 GeneRacer Kit 购自 Invitrogen (美国); Marker、Ex Taq DNA 聚合酶、r-Taq DNA 聚合酶、oligo (dT) 18、EcoR I 限制性内切酶、Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H<sup>-</sup>)、Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver. 3.0 以及荧光定量试剂盒 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq (Perfect Real Time) (TakaRa, 中国北京) 均购自宝日生物技术 (北京) 有限公司; Plasmid Mini Kit I 购自 Omega Bio-Tek (美国); AxyPrep DNA Gel Extraction Kit 购自 Axygen (美国); M-MLV 反转录酶和 pGEM-T easy 载体购自 Promega (美国); PCR 引物及 3'RACE 接头由上海生工生物工程有限公司合成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 Piwi 亚家族蛋白的预测

从家蚕基因组数据库 SilkDB 下载家蚕的基因组序列, 利用 BioEdit 软件建立本地家蚕基因组数据库。以 “piwi mRNA, complete cds” 为条件检索 NCBI 核酸数据库, 筛选所有符合条件的序列并获取相应的蛋白质序列, 通过在线 blastp 检测相似度。将 13 个已知的 Piwi 蛋白序列 (BAA93706、BAA93705、AAN75583、NP\_899181、ACH96370、XP\_344106、AAC97371、BAC81341、BAC81343、BAC81342、AAD08705、ABO26294、NP\_476734) 作为检索序列, 采用 TBLASTN 分别同源搜索家蚕基因组, 参数保持缺省, E 值小于  $1\text{E}-20$ 。搜索家蚕 EST 序列时, 匹配的序列必须满足如下的标准: (1) 序列相似性超过 95%; (2) 匹配的序列长度必须大于 160 bp。

### 1.2.2 总 RNA 提取及 cDNA 第 1 链的合成

取 25 ~ 30 mg 家蚕卵 (产下 6 h 内)、新蜕皮 1 ~ 5 龄幼虫、蛹和成虫; 解剖 5 龄幼虫的精巢、卵巢、马氏管、丝腺、头和中肠共 6 种组织, 每组样本准备 3 个重复。5 min 液氮速冻后在预冷的匀浆器中迅速研磨至粉末状, 采用 TRIzol<sup>®</sup> Reagent, 依据说明书提取总 RNA。总 RNA 的浓度及纯度用分光光度计 (Eppendorf 公司, 德国) 检测, 完整性经 1% 琼脂糖凝胶检测。参照 Reverse Transcriptase M-MLV 方法合成 cDNA 第一链。参照 GeneRacer Kit 试剂盒合成 5'-RACE-Ready cDNA; 参照 M-MLV 反转录酶转录方法, 用 3'-RACE 接头替换 oligo (dT) 18, 合成 3'-RACE-Ready cDNA 第一链, 3'-RACE 接头序列同 SMART RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒中 3'-RACE 接头序列 (由上海生工合成)。

### 1.2.3 引物设计

依据预测的家蚕 Piwi 蛋白基因序列, 利用 primer premier 5.0 软件设计引物。5'-RACE 的引物根据 GeneRacer kit 要求设计; 3'-RACE 的引物根据 SMART RACE cDNA Amplification Kit 要求设计。本实验中所用引物序列详见表 1。

### 1.2.4 家蚕 *siwi1* 和 *siwi2* 中间片段的克隆

依据预测的家蚕 Piwi 蛋白序列, 利用 primer premier 5.0 软件设计引物 (表 1) 进行 cDNA 片段克隆, 以 1.2.2 中反转录 cDNA 为模板, 使用 *Ex Taq* DNA 聚合酶进行 RT-PCR 扩增, 50  $\mu$ L 反应体系: 10  $\times$  *Ex Taq* Buffer 5  $\mu$ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 4  $\mu$ L, 上下游引物 (10 mmol/L) 各 2  $\mu$ L, cDNA 0.5  $\mu$ L, *Taq* 酶 0.25  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 32.25  $\mu$ L。*siwi1* RT-PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 35 cycles  $\times$  [94 $^{\circ}$ C 50 s, 55 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min]; 72 $^{\circ}$ C 10 min。*siwi2* RT-PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 3 cycles (每降 1 度)  $\times$  [94 $^{\circ}$ C 50 s, 65 $^{\circ}$ C ~ 53 $^{\circ}$ C 梯度退火 50 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min]; 20 cycles  $\times$  [94 $^{\circ}$ C 50 s, 50 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min]; 72 $^{\circ}$ C 10 min。*siwi1* 全长 PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 35 cycles  $\times$  [94 $^{\circ}$ C 50 s, 53 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min]; 72 $^{\circ}$ C 10 min。产物采用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳, 再对目标产物进行回收, 采用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit 纯化回收 PCR 产物, 经连接、转化、提取质粒, 酶切和测序双检测, 确定目的基因正确插入质粒并表达, 克隆产物送往南京博亚公司测序。

### 1.2.5 家蚕 *siwi1* 和 *siwi2* 末端序列的 RACE 扩增

依据获得 *siwi1* 和 *siwi2* 中间片段信息, 设计特

异性引物 (表 1), 进行 RACE 扩增, 50  $\mu$ L 反应体系: 10  $\times$  *Ex Taq* Buffer 5  $\mu$ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 4  $\mu$ L, Mg<sup>2+</sup> (25 mol/L) 4  $\mu$ L, UPM (通用引物, Universal Primer) 3  $\mu$ L, GSP (10 mmol/L) (基因特异性引物, Gene-specific primer) 1  $\mu$ L, RACE cDNA 2  $\mu$ L, *Taq* 酶 0.25  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 30.75  $\mu$ L。RACE PCR 参照 GeneRacer Kit 试剂盒, RACE 巢式 PCR 反应体系同前, 仅将 UPM 换为 nupm, GSP 换为 ngsp, 反应产物稀释 100 倍作为模板。PCR 产物回收纯化后, 按照 1.2.4 中方法进行克隆测序。

### 1.2.6 实时荧光定量 PCR

取新生卵 (Egg, 产下 6 h 内)、初孵 1 龄幼虫 (1 L)、新蜕皮 2 ~ 5 龄幼虫 (2 L、3 L、4 L、5 L)、蛹和成虫共 8 个时期, 以 5 龄期家蚕 Piwi 蛋白基因表达量为参照; 取精巢、卵巢、马氏管、丝腺、头和中肠共 6 种组织, 以丝腺中 *siwi2* 基因的表达量为参照。在 1 次反应中, 重复 3 次; 制备 2 套 cDNA 模板进行 2 个独立的荧光定量 PCR 反应。参照 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq (Perfect Real Time) 试剂盒, 按照 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 复性延伸 31 s, 40 个循环进行定量反应。

### 1.2.7 基因结构、保守结构域

通过 NCBI 中的 ORFfinder 分析克隆获得的 Piwi 亚家族蛋白基因的开放阅读框, 并用 Gene-Explorer 软件推导其氨基酸序列; 将 Piwi 亚家族蛋白基因的核酸序列与家蚕基因组数据库进行比对, 分析其基因结构; 利用推导的氨基酸序列搜索 NCBI 蛋白质保守结构域数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), 预测 Piwi 亚家族蛋白中保守的结构域。利用在线版的 InterPro 软件 (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 对蛋白序列进行分析 (Mitchell *et al.*, 2019)。

### 1.2.8 进化分析

利用 “Piwi” 为关键词搜索 NCBI, 搜集已知的所有物种 Piwi 蛋白及其类似物 Piwil, 采用 MEGA 7.0.26 软件对获取的蛋白序列进行 ClustalW 序列比对, 参数为默认值。根据邻接法 (Neighbor-Joining) 构建系统进化树, 选择 Poisson Correction (泊松修正) 模型, 自举检验 Bootstrap 重复 1 000 次。利用在线软件 iTOL (Interactive Tree Of Life) (<http://itol.embl.de/index.shtml>) 对进化树进行优化处理。

### 1.3 数据分析

运用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法对定量数据进行分析。

表 1 引物列表  
Table 1 List of the primers

方法 Method	引物名 Primer name	序列 Sequence (5'-3')
cDNA 片段克隆 Cloning of cDNA	<i>siwi1</i> _forward	AGCACTGGAGTCCGAAAGGC
	<i>siwi1</i> _reverse	GCGACCACGTTGAACGAAGA
	<i>siwi1</i> _full F	GATGTCAGAACCAGAGGTTAGA
	<i>siwi1</i> _full R	CTCACGTTATGATTGCCGACTA
	<i>siwi2</i> _forward	TCAGTTGAATTG CAAACTGGG
	<i>siwi2</i> _reverse	CACATCTTGTACGTCAAACGCT
	Actin A3_forward	GCGCGGCTACTCGTTCCTACTACC
	Actin A3_reverse	GGATGTCCACGTCGCACTTCA
5' RACE 扩增 Amplification of 5' RACE	<i>siwi1</i> _5'gsp	TTTGCTTCAGGGTCAAAAATAATCCCGTC
	<i>siwi1</i> _5'ngsp	CCATCGGATCAGGATGCAGACGATTTAC
	<i>siwi2</i> _5'gsp	TTGTACGACAACATAGGTCAGGGTAGGC
	<i>siwi2</i> _5'ngsp	CGATGCTACAAAACGCAAACGCTCCG
3' RACE 扩增 Amplification of 3' RACE	<i>siwi1</i> _3'gsp	CTGTAGACCGAGCCGTGCCGACGCAG
	<i>siwi1</i> _3'ngsp	CCGCGAGAAAAACGGGACCTACCCAG
	<i>siwi2</i> _3'gsp	GGTGTAGGCGACGGGCAGCTGAAGTT
	<i>siwi2</i> _3'ngsp	CGTGGTGGTCTACGACGACAGCGGGAT
反转录 PCR RT-PCR	<i>siwi1</i> _forward	AGCACTGGAGTCCGAAAGGC
	<i>siwi1</i> _reverse	GCGACCACGTTGAACGAAGA
	<i>siwi2</i> _forward	TCAGTTGAATTG CAAACTGGG
	<i>siwi2</i> _reverse	CACATCTTGTACGTCAAACGCT
	Actin A3_forward	GCGCGGCTACTCGTTCCTACTACC
	Actin A3_reverse	GGATGTCCACGTCGCACTTCA
荧光定量 PCR qRT-PCR	<i>siwi1</i> _Q forward	GTGCGGGTCTGCCTGAGTTG
	<i>siwi1</i> _Q reverse	GGTGTGCTTGTGAATCTCCTGTGTG
	<i>siwi2</i> _Q forward	AGCCTACCCTGACCTATGTTG
	<i>siwi2</i> _Q reverse	ACCAGTCCCGTCTCGTTATAC
	<i>Rp49</i> _Q forward	AGGCATCAATCGGATCGCTATG
	<i>Rp49</i> _Q reverse	TTGTGAACTAGGACCTTACGGAATC
	<i>GAPDH</i> _Q forward	CGCTGGAATTTCTTTGAATGAC
	<i>GAPDH</i> _Q reverse	CAATGACTCTGCTGGAATAACC

## 2 结果与分析

### 2.1 家蚕 Piwi 亚家族蛋白基因的预测与克隆

利用 13 个已知的 Piwi 亚家族蛋白在家蚕基因

组中进行同源搜索,发现 2 个 Piwi 蛋白基因,分别命名为 *siwi1* 和 *siwi2*。*siwi1* 共 1 482 bp; *siwi2* 共 1 530 bp。依据预测的 *siwi1* 和 *siwi2* 的基因序列,设计特异性引物进行 PCR 扩增。2% 琼脂糖凝胶电泳获得 2 条 PCR 产物条带大小,其中 1 条约

1 800 bp, 另 1 条约 600 bp, 测序结果与预测的 *siwi1* 和 *siwi2* 基因序列比较分析发现, *siwi1* 条带长度为 1 835 bp, 与预测大小相似, *siwi2* 条带长度为 581 bp, 与预测结果差异较大 (图 1)。

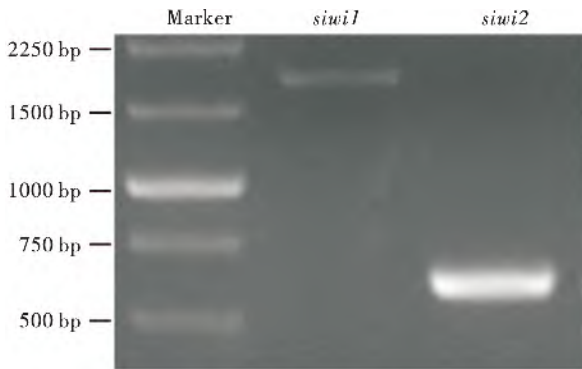


图 1 家蚕两个 Piwi 亚家族蛋白基因的克隆

Fig. 1 Cloning of two Piwi subfamily genes from *Bombyx mori*

## 2.2 家蚕 Piwi 亚家族基因全长克隆

合成 *siwi1* 和 *siwi2* 的 5'及 3'RACE 模板, 采用持家基因 Actin A3 进行 PCR 反应检测模板质量。2% 琼脂糖凝胶电泳检测显示, 5'及 3'RACE 模板均能扩增获得 Actin A3 的阳性克隆产物 (图 2-A), 表明模板质量可行。依据克隆获得的基因片段, 利用 RACE 技术分别扩增 *siwi1* 和 *siwi2* 的 5'和 3'末端, 2% 琼脂糖凝胶电泳结果以及测序分析结果表明, 成功克隆获得了 *siwi1* 和 *siwi2* 基因的 3'末端 cDNA, *siwi1* 3'末端 cDNA 序列长度为 1 444 bp, *siwi2* 3'末端 cDNA 序列长度为 305 bp, 而仅有基因上游特异引物 gsp 或 ngsp、仅有 3'RACE 下游通用引物 upm 或 nupm 以及没有模板的阴性对照 blank 中均不能检测到条带 (图 2-B, C)。但多次试验后仍不能克隆获得 *siwi1* 和 *siwi2* 的 5'端序列, 可能是合成的 5'RACE 模板中, *siwi1* 和 *siwi2* 基因的表达丰度不高。将克隆获得的 *siwi1* 和 *siwi2* 基因序列与 RACE 技术扩增获得的 *siwi1* 和 *siwi2* 序列分别进行拼接, 拼接后的 *siwi1* 序列长度为 2 746 bp, *siwi2* 序列长度为 823 bp。为获取 *siwi1* 基因 cDNA 序列全长, 利用已知 Piwi 亚家族蛋白搜索家蚕 EST 序列, 找出所有可能的 *siwi1* 基因的 EST 序列, 再将拼接获得的 *siwi1* 序列与搜索出来的 EST 序列比对, 拼接出 *siwi1* 基因 cDNA 序列全长。最后, 对获得的 *siwi1* 基因序列设计特异性引物进行 PCR 扩增, 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 测序分析结果显示该条带为目标基因 *siwi1*, 而只有单

引物 F 和 R 以及无模板的阴性对照中均不能检测到相同条带 (图 2-D), 该基因 cDNA 全长 3 277 bp (GenBank 登录号: MH780859), 包含部分 5'UTR、编码 899 个氨基酸的完整开放阅读框和一段 576 bp 的 3'UTR, 其中 3'UTR 包含一段由 40 个腺苷酸组成的 poly A 尾巴, 比对 NCBI 发现该基因为 *BmPiwi*。而 *siwi2* 基因, 仅获得了 823 bp 的转录本序列, 编码 239 个氨基酸, 其中 3'UTR 区共 103 bp, 含有一段由 30 个腺苷酸组成的 poly A 尾巴, 比对 NCBI 发现该基因为 *BmAgo3*。

## 2.3 家蚕 Piwi 亚家族蛋白的特征分析

与家蚕基因组序列比对发现, *BmPiwi* 基因含有 18 个外显子和 17 个内含子, 其中第 2 个内含子跨度最大, 共 3 828 bp (表 2)。通过搜索 NCBI 蛋白质保守结构域数据库发现, *BmPiwi* 含有 Argonaute 蛋白家族特征性的保守结构域: PAZ (位于氨基酸序列的 316 ~ 451 残基) 和 PIWI (位于氨基酸序列的 437 ~ 879 残基) (图 2-E), 在 PAZ 结构域中包含小 RNA 3'位点, PIWI 结构域中包含 5'RNA 引导链锚定位点和剪切三联体活性位点 (DDH: Asp-Asp-Asp/His/Glu/Lys)。

## 2.4 家蚕 Piwi 亚家族蛋白的进化分析

构建不同物种 PIWI 亚家族蛋白系统发生树, 进化分析结果 (图 3) 显示, PIWI 亚家族蛋白在进化过程中高度保守, PIWI 亚家族蛋白依据不同家族类别进行聚集, 在脊椎动物中尤为明显。PIWI 亚家族蛋白主要存在于脊椎动物中, 约占已知 PIWI 蛋白的一半, 在鱼类和哺乳动物中存在多种不同类型的 PIWI-like 蛋白 (Pwi1), 如人 *Homo sapiens* 和猴子 *Macaca mulatta* 中发现 4 种 Pwi1 蛋白。昆虫已知的 PIWI 蛋白数仅次于脊椎动物。家蚕 Piwi 亚家族蛋白与乳草长蝻 *Oncopeltus fasciatus*、黑腹果蝇、柑橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis*、优雅蝨蠹 *Gampsocleis gratiosa*、斯氏按蚊 *Anopheles stephensi*、褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 的 PIWI 蛋白以及东亚飞蝗 *Locusta migratoria* 的 PIWI2 和 PIWI3 蛋白亲缘关系最近, 和三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus* 的 PIWI2 和 PIWI3 同为一支, 与脊椎动物的 PIWI2 和刺胞动物的 PIWI 相似性也较高 (图 3)。

家蚕 AGO3 蛋白与小菜蛾 AGO3 亲缘关系最近, 与西方玉米根虫 *Diabrotica virgifera virgifera*、白蜡窄吉丁 *Agrilus planipennis* 的 AGO3 及东亚飞蝗 *Locusta migratoria* 的 PIWI1 同属一支, 与橘小实蝇

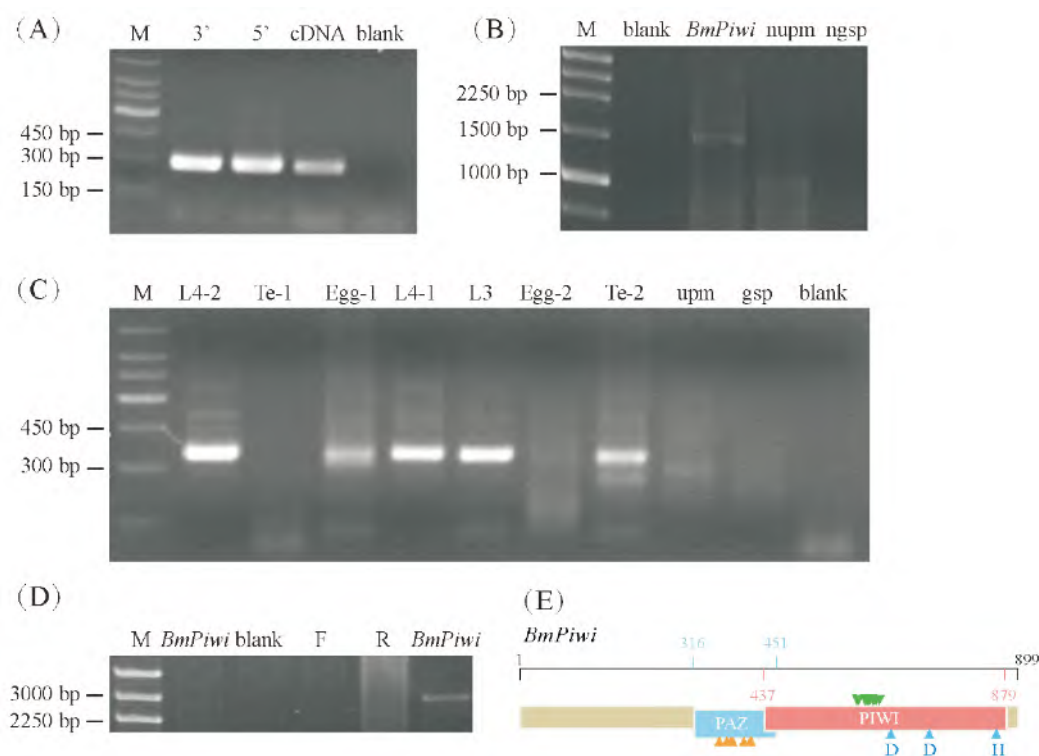


图2 家蚕2个Piwi亚家族蛋白基因的全长克隆及结构分析

Fig. 2 Full length cloning and structure analyzing of two Piwi subfamily genes from *Bombyx mori*

注: (A), PCR扩增持家基因 *Actin A3* 检测模板质量; (B), RACE扩增 *BmPiwi* 3'末端; (C), RACE扩增 *BmAgo3* 3'末端, 分别以精巢、卵、3龄幼虫、4龄幼虫的3'RACE模板进行RT-PCR扩增; (D), PCR扩增 *BmPiwi* 全长; (E), *BmPiwi* 结构与分析。Te, 精巢; L, 幼虫; -1, 第一组; -2, 第二组; M, Marker; blank, 不含模板的阴性对照; gsp/ngsp, 单上游基因特异引物; upm/nupm, 单下游3'RACE通用引物; F, 上游引物; R, 下游引物; 金黄色小三角代表核酸结合位点, 绿色小三角代表5'RNA引导链锚定位点, 蓝色小三角代表剪切三联体活性位点 (DDH: Asp-Asp-Asp/His/Glu/Lys)。Note: (A), Check the RACE templates with housekeeping gene *Actin A3* by PCR; (B), 3'RACE PCR of *BmPiwi*; (C), 3'RACE PCR of *BmAgo3*, RT-PCR performed with 3'RACE templates of testis, egg, 3<sup>rd</sup> instar larvae and 4<sup>th</sup> instar larvae, respectively; (D), PCR amplification of *BmPiwi* full-length; (E), Structure analysis of *BmPiwi*. Te, Testis; L, Larvae; -1, First group; -2, Second group; M, Marker; blank, Negative control without template; gsp/ngsp, Single upstream gene-specific primer; upm/nupm, Single downstream 3'RACE universal primer; F, Upstream primer; R, Downstream primer; Golden yellow triangles represented nucleic acid binding sites; Green triangles represented 5'NA guiding strand anchoring sites; Blue triangles represented shear triplet activity site (DDH: Asp-Asp-sp/His/Glu/Lys).

的AGO3同属一总支;与海绵动物和刺胞动物的PIWI蛋白以及栉水母门动物的海醋栗 *Pleurobrachia bachei* 的PIWI蛋白相似性也较高(图3)。AGO蛋白的种类明显多于PIWI蛋白,丹参 *Salvia miltiorrhiza* 中AGO蛋白总数可达10种之多,尘螨 *Dermatophagoides farinae* 和番茄 *Solanum lycopersicum* 中的AGO蛋白也有8种,陆生植物AGO蛋白种类普遍较多。同一类型的AGO蛋白呈同一聚簇,与PIWI蛋白呈现明显的分支,但家蚕AGO3蛋白以及锥虫属的AGO1蛋白却与PIWI蛋白同属一支(图3)。

## 2.5 家蚕Piwi亚家族蛋白基因的时空表达谱

### 2.5.1 家蚕Piwi亚家族蛋白基因的组织表达情况

采用持家基因 *Actin A3* 进行RT-PCR反应检测模板质量,2%琼脂糖凝胶电泳检测结果(图4-A)显示样品无基因组污染,模板质量可行,*BmPiwi*和*BmAgo3*基因在卵巢中条带稍暗,在精巢中的条带明显亮于其他组织,表明家蚕2个Piwi亚家族蛋白基因在卵巢中的表达弱于精巢组织,在精巢组织中高表达。此外,在家蚕的消化道、头部也能检测到*BmPiwi*的表达,但在马氏管和丝腺中表达量较低。在家蚕头部中也能检测到*BmAgo3*基因的表达。

表 2 *BmPiwi* 在染色体上的定位  
Table 2 Chromosome locations of *BmPiwi*

基因 Gene	位置 Location	链 Strand	CDS 外显子 CDS exon	位置 Position	
				起点 Start	终点 End
<i>BmPiwi</i>	nscaf2998	+	Exon 1	109 838	110 139
			Exon 2	110 265	110 400
			Exon 3	114 228	114 389
			Exon 4	115 288	115 400
			Exon 5	115 620	115 753
			Exon 6	115 958	116 064
			Exon 7	116 179	116 275
			Exon 8	116 359	116 487
			Exon 9	116 560	116 823
			Exon 10	116 999	117 141
			Exon 11	117 457	117 604
			Exon 12	118 058	118 173
			Exon 13	118 250	118 383
			Exon 14	118 720	118 960
			Exon 15	119 125	119 204
			Exon 16	119 408	119 583
			Exon 17	119 951	120 051
			Exon 18	120 436	120 600

荧光定量 PCR 结果 (图 4-B) 显示, 在选取的不同组织中, *BmPiwi* 基因的表达量都明显高于 *BmAgo3* 基因 (4 ~ 13 倍)。 *BmPiwi* 和 *BmAgo3* 两个基因在丝腺中的表达量最低, 在消化道中的表达量略高于丝腺, 但略低于马氏管; 在精巢中的表达明显高于其他组织, 是丝腺中的 10 倍; 在卵巢中表达仅次于精巢, 是丝腺中的 6 倍。 *BmPiwi* 在头部的表达量略低于卵巢, 高于丝腺、马氏管和消化道, 但 *BmAgo3* 基因在头部表达丰度最高。

### 2.5.2 家蚕 Piwi 亚家族蛋白基因不同发育时期表达情况

荧光定量 PCR 检测家蚕 2 个 Piwi 亚家族蛋白基因在不同发育时期的表达 (以 5 龄家蚕 Piwi 表达量作为参照), 结果 (图 4-C) 显示, 家蚕 2 个 Piwi 亚家族蛋白基因在新生卵 (产下 6 h 内) 中表达量最高, 分别是 5 龄期的 44 倍 (*BmPiwi*) 和 32 倍 (*BmAgo3*)。进入幼虫期, 其表达量迅速下

降, 整个幼虫期均维持低表达状态, 蛹期开始表达量迅速上升。 *BmPiwi* 在 4 龄期表达量最低, 5 龄开始表达量略微回升, 成虫期表达量上升至 5 龄期的 15 倍, 达到不同发育阶段 *BmPiwi* 表达量的第 2 高点。 *BmAgo3* 与 *BmPiwi* 表达趋势大体相同, 但不同于 *BmPiwi* 的是, *BmAgo3* 在 2 龄期表达量明显高于 1 龄期, 且在 5 龄期表达量达到最低。此外, *BmAgo3* 在蛹期表达量为 5 龄期 14 倍, 并持续该状态至成虫期。

## 3 结论与讨论

1997 年在果蝇卵巢中发现了第 1 个 Piwi 亚家族蛋白 (Lin and Spradling, 1997), 此后发现 Piwi 亚家族蛋白与小 RNA 结合形成 piRNA, 作为沉默复合体的核心蛋白而行使功能 (Aravin *et al.*, 2006)。研究表明 PAZ 和 PIWI 结构域是该家族蛋



## 色带和标签 Colorstrips &amp; Lables

- 脊索动物 Chordates
- 节肢动物 Arthropods
- 扁形动物 Flatworms
- 刺胞动物 Cnidarians
- 栉水母 Ctenophores
- 海绵动物 Sponges
- 棘皮动物 Echinoderms
- 软体动物 Molluscs
- 轮虫动物 Rotifers
- 陆生植物 Land plants
- 子囊菌类 Ascomycetes
- 锥虫科 Trypanosomatidae
- 真球虫目 Eucoccidiorida
- 卵菌类 Oomycetes
- Ago
- Ago1
- Ago2
- Ago3
- Ago4
- Ago5
- Ago6
- Ago7
- Ago8
- Ago9
- Ago10
- Ago16
- Piwi
- Piwi1 & Piwi1
- Piwi2 & Piwi2
- Piwi3 & Piwi3
- Piwil4
- ★ BmPiwi
- ▲ BmAgo3

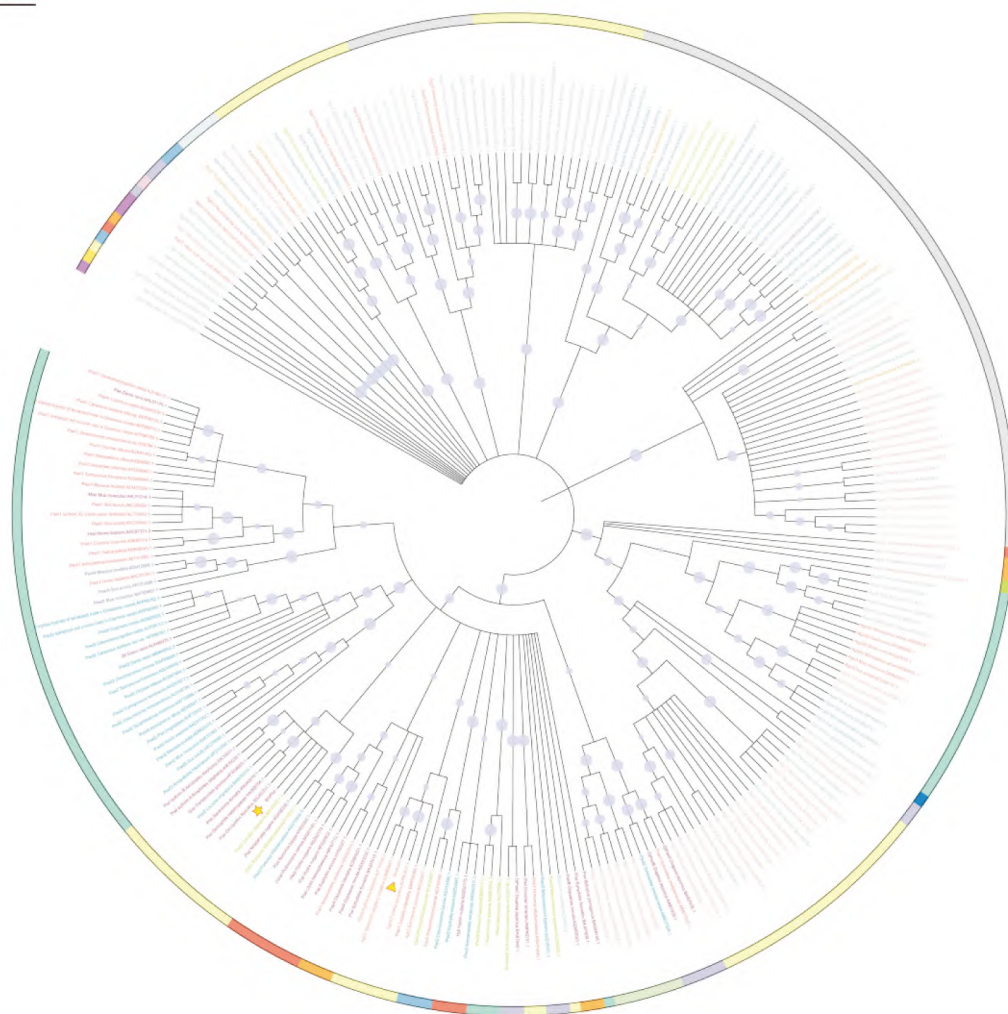


图3 已知 Piwi 和 Ago 亚家族成员系统发生树

Fig. 3 Phylogenetic tree of known Piwi and Ago subfamily members

注: Piwil, Piwi like protein, Piwi 类似蛋白。Note: Piwil represented Piwi like protein.

白的保守结构域, PIWI 结构域具有与 RNaseH 相似的结构特征 (Parker *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2004; Rivas *et al.*, 2005; Rashid *et al.*, 2007)。小鼠 *Mus musculus* 神经元中的 PIWIL1 结构域分析表明, PIWIL1 中的 RNA 结合 PAZ 结构域和 RNA 加工 PIWI 结构域对其在神经元迁移中不可或缺 (Zhao *et al.*, 2015)。本研究克隆获得了 *BmPiwi* 基因的全长, 分析发现其包含 PAZ 和 Piwi 结构域。进化分析结果显示, *BmPiwi* 与 *BmAgo3* 在不同物种中高度保守, 但不同类型的 Piwi 及 Piwi 类似物 Piwil 聚集在不同的分支中, 可能是因为 Piwi 亚家族蛋白具有功能多样性。例如生殖干细胞 Piwil2 的异位表达与肿瘤干细胞的发育相关, 同时也是修复各种遗传毒物诱导的 DNA 损伤过程所必需的

(Yin *et al.*, 2011); Piwil3 在各种癌症中过表达, 可以促进胃癌细胞的增值、转移和侵袭; 在生殖细胞中表达的 PIWIL4, 在精子发生的第一阶段起重要作用, 同时也是转录沉默所必需的 (Munoz *et al.*, 2014)。*BmPiwi* 与 *BmAgo3* 在进化树中处于不同分支, 距离相对较远, 推测可能是由于功能不同所致。

早期研究表明 PIWI 蛋白在生殖细胞中表达, 并参与生殖细胞的发育、维持、分裂和分化 (Cox *et al.*, 1998)。Piwi 突变可以导致果蝇雌雄生殖干细胞的增殖能力消失 (Lin and Spradling, 1997)。近期研究显示, Piwi 可以通过激活表观遗传的调节、沉默转座子和维持染色质结构来保护生殖细胞, 同时也参与包括细胞增殖、分化和生存在内

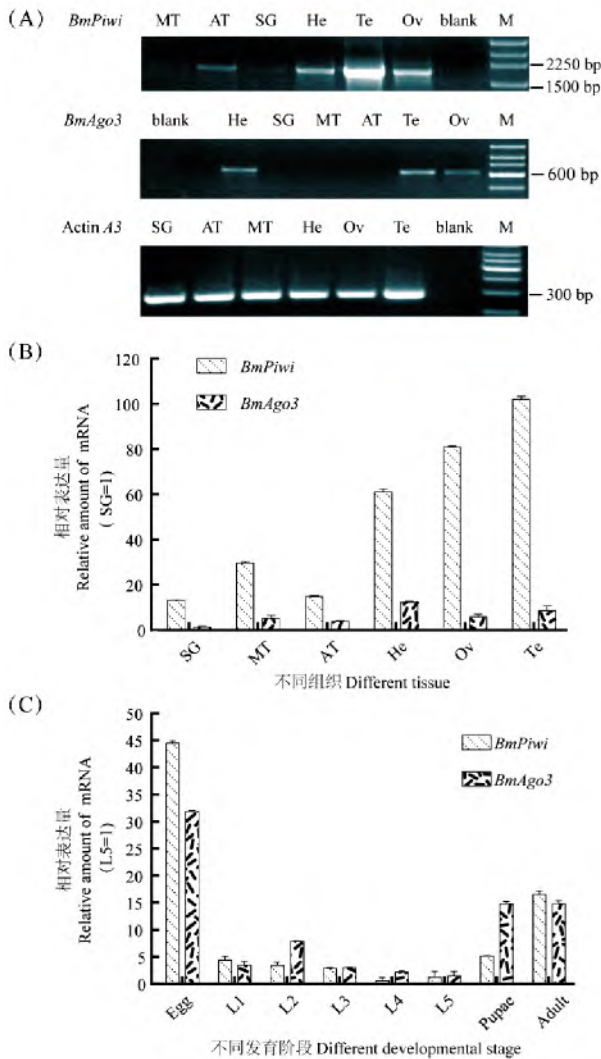


图4 家蚕两个 *Piwi* 亚家族蛋白基因在不同组织和不同发育阶段的表达

Fig. 4 Detection of *BmPiwi* and *BmAgo3* expression in different tissues and different developmental stages of silkworm

注: (A), RT-PCR 检测 *BmPiwi* 和 *BmAgo3* 在家蚕不同组织中的表达情况; (B), 定量 PCR 检测 *BmPiwi* 和 *BmAgo3* 在家蚕不同组织中的表达情况; (C), 定量 PCR 检测 *BmPiwi* 和 *BmAgo3* 在家蚕不同发育阶段的表达情况。MT, 马氏管; AT, 消化道; SG, 丝腺; He, 头; Te, 精巢; Ov, 卵巢; L, 幼虫。Note: (A), Detection of *BmPiwi* and *BmAgo3* expression in different tissues of silkworm by RT-PCR; (B), Expression profile of *BmPiwi* and *BmAgo3* expression in different tissues of silkworm by quantitative real time PCR; (C), Expression profile of *BmPiwi* and *BmAgo3* in different developmental stages of silkworm by quantitative real time PCR. MT, Malpighian tube; AT, Alimentary tract; SG, Silk gland; He, Head; Te, Testis; Ov, Ovary; L, Larvae.

的许多重要生物过程 (Ponnusamy *et al.*, 2017)。本研究检测了家蚕 *BmPiwi* 与 *BmAgo3* 的发育表达

谱,发现 *BmPiwi* 与 *BmAgo3* 在新生卵中高表达,在 1 龄幼虫中表达量都显著下降, *BmPiwi* 表达量维持下降趋势至 4 龄幼虫达到最低值,而 *BmAgo3* 在 2 龄时表达量出现回升,但 3 龄开始表达量再次下降,到 5 龄达到最低值。与 Alfons Navarro 等人 (Navarro *et al.*, 2015) 对人肺胚胎发生阶段的 *Piwil* mRNA 表达分析结果相似, *PIWIL1* 在 7 周胚胎中高表达,并在随后的 6~13 周表达量显著下调,而 *PIWIL2* 在 8 周时表达水平出现回升持续到 10 周后再次下降。Zhao 等 (Zhao *et al.*, 2015) 利用原位杂交实验分析发育中的小鼠脑中 *PIWIL1* mRNA 表达情况,结果显示 *PIWIL1* 在胚胎 13 周高表达,随后表达量显著下调。对果蝇的相关研究显示, *Piwi* 是果蝇卵巢生殖干细胞维持和分化必须的核糖核蛋白, *PIWI* 可以通过抑制体细胞小生境 (由临近生殖干细胞的细胞组成) 中的 *c-FOS* 的表达从而调控生殖干细胞功能和卵巢体细胞的细胞组织,组织形态和产卵 (Cox *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 2016)。由此推测家蚕 *piwi* 亚家族蛋白基因在卵期高表达对细胞的分裂分化具有重要作用。

*PIWI/piRNA* 的动态表达模式对于哺乳动物卵子发生以及早期胚胎发生都有着显著的影响,但即使在相同器官中,发挥功能的 *Piwi* 也不尽相同。例如, *PIWIL1* 和 *PIWIL2* 在成人卵巢卵母细胞中高表达,胚胎卵母细胞中只有 *PIWIL2* 高表达 (Roovers *et al.*, 2015),而牛卵巢仅表达 *PIWIL1*,但是在提取的牛卵泡卵母细胞中却发现成熟的卵母细胞特异性强烈表达 *PIWIL3* (Roovers *et al.*, 2015)。此外,小鼠 *MIWI* 在新生卵巢中高表达,随着卵巢的成熟表达量下调,而在成年小鼠的初级卵泡、次级卵泡以及卵母细胞中都可以检测到 *MIWI* 的表达,表明 *Piwi* 在卵细胞中高表达,且与卵母细胞的成熟与激活息息相关 (Ding *et al.*, 2013)。本研究在家蚕卵巢中检测到 *BmPiwi* 与 *BmAgo3* 的高表达, *BmPiwi* 表达量显著高于 *BmAgo3*,推测是由于 *BmPiwi* 在家蚕卵巢中起主要作用。*PIWI* 对于雄性生殖也具有重要作用,对突发性非梗阻性无精子症患者的研究证实 *HIWI2* (*PIWIL4*) 是正常精子发生第一时期所必须的, *HIWI2* 基因遗传多态性与精子形成和男性不育密切相关 (Zeeba Kamaliyan *et al.*, 2017; Rewicz *et al.*, 2018)。对家蚕精巢 *Piwi* 基因的检测显示, *BmPiwi* 的表达量明显高于 *BmAgo3*,推测其在精巢

中起主要作用。

除生殖器官精巢和卵巢, Piwi 基因在多个器官中均有分布, 包括脑、心脏、肺、肝脏、肾脏、胰腺、胃等, 除病理情况, Piwi 在生殖器官中表达量普遍偏高。本研究发现 *BmPiwi* 在家蚕头部的表达量仅次于卵巢, 而 *BmAgo3* 在头部表达量最高, 在家蚕预蛹期阶段, *BmAgo3* 的表达量明显高于 *BmPiwi*, 家蚕的发育受激素和神经双重调控, 而头部是昆虫感觉中心, 故 *BmPiwi* 和 *BmAgo3* 在头部高表达。研究显示, 小鼠 PIWIL1 可以通过调控微管相关蛋白来调控神经元的极化与迁移 (Zhao *et al.*, 2015), 因此, *BmAgo3* 很可能对家蚕神经元起调控作用。此外, 在家蚕消化道、丝腺、马氏管均检测到 *BmPiwi* 和 *BmAgo3* 基因的表达, 马氏管中的表达量略高于消化道和丝腺, 但在家蚕幼虫期 *BmPiwi* 和 *BmAgo3* 的表达量均不高。已有文献报道, Piwi 家族成员参与代谢活动, 例如, 果蝇中 Piwi 和 piRNA 参与脂肪代谢过程 (Jones *et al.*, 2016), 小鼠 Piwi 蛋白及其相关的 piRNA 通过控制  $\beta$  细胞调控糖类代谢 (Henaoui *et al.*, 2017), 但对于消化道、丝腺和马氏管, Piwi 基因可能并不发挥主要调控作用。Kawaoka 等对家蚕 Piwi 情况进行了探究, 但其主要关注于精子发生和卵子形成, 且采用的是芯片数据分析 Piwi 家族的表达谱, 未进行 RT-PCR 验证 (Kawaoka *et al.*, 2008)。本研究补充了家蚕 Piwi 亚家族基因从卵至成虫时期表达情况, 并探究了 Piwi 基因在各个组织中的表达情况, 对家蚕的后续研究具有指导作用。

### 参考文献 (References)

- Aravin A, Gaidatzis D, Pfeffer S, *et al.* A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes [J]. *Nature*, 2006, 442 (7099): 203–207.
- Batista PJ, Ruby JG, Claycomb JM, *et al.* PRG-1 and 21U-RNAs interact to form the piRNA complex required for fertility in *C. elegans* [J]. *Molecular Cell*, 2008, 31 (1): 67–78.
- Carmell MA, Xuan Z, Zhang MQ, *et al.* The Argonaute family: Tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis [J]. *Genes & Development*, 2002, 16 (21): 2733–2742.
- Cox DN, Chao A, Baker J, *et al.* A novel class of evolutionarily conserved genes defined by Piwi are essential for stem cell self-renewal [J]. *Genes & Development*, 1998, 12 (23): 3715–3727.
- Das PP, Bagijn MP, Goldstein LD, *et al.* Piwi and piRNAs act upstream of an endogenous siRNA pathway to suppress Tc3 transposon mobility in the *Caenorhabditis elegans* germline [J]. *Molecular Cell*, 2008, 31 (1): 79–90.
- Ding X, Guan H, Li H. Characterization of a piRNA binding protein miwi in mouse oocytes [J]. *Theriogenology*, 2013, 79 (4): 610–615. e1.
- Ewen-Campen B, Jones TE, Extavour CG. Evidence against a germ plasm in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*, a hemimetabolous insect [J]. *Biology Open*, 2013, 2 (6): 556–568.
- Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ, *et al.* A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins [J]. *Nature*, 2006, 442 (7099): 199–202.
- Grivna ST, Beyret E, Wang Z, *et al.* A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells [J]. *Genes & Development*, 2006, 20 (13): 1709–1714.
- Henaoui IS, Jacovetti C, Guerra MI, *et al.* Piwi-interacting RNAs as novel regulators of pancreatic beta cell function [J]. *Diabetologia*, 2017, 60 (10): 1977–1986.
- Hock J, Weinmann L, Ender C, *et al.* Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-protein complexes in human cells [J]. *EMBO Reports*, 2007, 8 (11): 1052–1060.
- Houwing S, Kamminga LM, Berezikov E, *et al.* A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish [J]. *Cell*, 2007, 129 (1): 69–82.
- James SP, Roe SM, Barford D. Structural insights into mRNA recognition from a Piwi domain-siRNA guide complex [J]. *Nature*, 2005, 434 (7033): 663–666.
- Jones BC, Wood JG, Chang C, *et al.* A somatic piRNA pathway in the *Drosophila* fat body ensures metabolic homeostasis and normal lifespan [J]. *Nature Communication*, 2016, 7: 13856.
- Kawaoka S, Minami K, Katsuma S, *et al.* Developmentally synchronized expression of two *Bombyx mori* Piwi subfamily genes, SIWI and *BmAgo3* in germ-line cells [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 367 (4): 755–760.
- Klein JD, Qu C, Yang X, *et al.* c-Fos repression by Piwi regulates *Drosophila* ovarian germline formation and tissue morphogenesis [J]. *PLoS Genetics*, 2016, 12 (9): e1006281.
- Klenov MS, Sokolova OA, Yakushev EY, *et al.* Separation of stem cell maintenance and transposon silencing functions of Piwi protein [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108 (46): 18760–18765.
- Ku HY, Lin H. Piwi proteins and their interactors in piRNA biogenesis, germline development and gene expression [J]. *National Science Review*, 2014, 1 (2): 205–218.
- Lau NC, Seto AG, Kim J, *et al.* Characterization of the piRNA complex from rat testes [J]. *Science*, 2006, 313 (5785): 363–367.
- Lin H, Spradling AC. A novel group of pumiliomutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary [J]. *Development*, 1997, 124 (12): 2463–2476.
- Mani SR, Megosh H, Lin H. Piwi proteins are essential for early *Drosophila* embryogenesis [J]. *Developmental Biology*, 2014, 385 (2): 340–349.
- Mitchell AL, Attwood TK, Babbitt PC, *et al.* InterPro in 2019:

- Improving coverage , classification and access to protein sequence annotations [J]. *Nucleic Acids Research* ,2019 ,47 ( D1 ) : D351 – D360.
- Munoz X , Navarro M , Mata A , *et al.* Association of PIWIL4 genetic variants with germ cell maturation arrest in infertile Spanish men [J]. *Asian Journal of Andrology* ,2014 ,16 ( 6 ) : 931 – 933.
- Navarro A , Tejero R , Vinolas N , *et al.* The significance of Piwi family expression in human lung embryogenesis and non – small cell lung cancer [J]. *Oncotarget* ,2015 ,6 ( 31 ) : 31544 – 31556.
- Ozata DM , Gainetdinov I , Zoch A , *et al.* Piwi – interacting RNAs: Small RNAs with big functions [J]. *Nature Reviews Genetics* ,2019 ,20 ( 2 ) : 89 – 108.
- Palakodeti D , Smielewska M , Lu YC , *et al.* The PIWI proteins SMEDWI – 2 and SMEDWI – 3 are required for stem cell function and piRNA expression in planarians [J]. *RNA* ,2008 ,14 ( 6 ) : 1174 – 1186.
- Parker JS , Roe SM , Barford D. Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity [J]. *EMBO Journal* ,2004 ,23 ( 24 ) : 4727 – 4737.
- Peter WR , Ne'stor J. Oviedo , Joya RJ , *et al.* SMEDWI – 2 is a PIWI – like protein that regulates planarian stem cells [J]. *Science* ,2005 ,310 ( 5752 ) : 1327 – 1330.
- Ponnusamy M , Yan KW , Liu CY , *et al.* PIWI family emerging as a decisive factor of cell fate: An overview [J]. *European Journal of Cell Biology* ,2017 ,96 ( 8 ) : 746 – 757.
- Rajasethupathy P , Antonov I , Sheridan R , *et al.* A role for neuronal piRNAs in the epigenetic control of memory – related synaptic plasticity [J]. *Cell* ,2012 ,149 ( 3 ) : 693 – 707.
- Rashid UJ , Paterok D , Koglin A , *et al.* Structure of *Aquifex aeolicus* argonaute highlights conformational flexibility of the PAZ domain as a potential regulator of RNA – induced silencing complex function [J]. *Journal of Biological Chemistry* ,2007 ,282 ( 18 ) : 13824 – 13832.
- Rewicz A , Rewers M , Jedrzejczyk I , *et al.* Morphology and genome size of *Epipactis helleborine* ( L. ) Crantz ( Orchidaceae ) growing in anthropogenic and natural habitats [J]. *PeerJ* ,2018 ,6 : e5992.
- Rinkevich Y , Rosner A , Rabinowitz C , *et al.* Piwi positive cells that line the vasculature epithelium , underlie whole body regeneration in a basal chordate [J]. *Developmental Biology* ,2010 ,345 ( 1 ) : 94 – 104.
- Rivas FV , Tolia NH , Song JJ , *et al.* Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC [J]. *Nature Structural & Molecular Biology* ,2005 ,12 ( 4 ) : 340 – 349.
- Rizzo F , Hashim A , Marchese G , *et al.* Timed regulation of P – element – induced wimpy testis – interacting RNA expression during rat liver regeneration [J]. *Hepatology* ,2014 ,60 ( 3 ) : 798 – 806.
- Roovers EF , Rosenkranz D , Mahdipour M , *et al.* Piwi proteins and piRNAs in mammalian oocytes and early embryos [J]. *Cell Reports* ,2015 ,10 ( 12 ) : 2069 – 2082.
- Saito K , Ishizu H , Komai M , *et al.* Roles for the Yb body components Armitage and Yb in primary piRNA biogenesis in *Drosophila* [J]. *Genes & Development* ,2010 ,24 ( 22 ) : 2493 – 2498.
- Saito K , Nishida KM , Mori T , *et al.* Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the *Drosophila* genome [J]. *Genes & Development* ,2006 ,20 ( 16 ) : 2214 – 2222.
- Seto AG , Kingston RE , Lau NC , The coming of age for Piwi proteins [J]. *Molecular Cell* ,2007 ,26 ( 5 ) : 603 – 609.
- Sivagurunathan S , Palanisamy K , Arunachalam JP , *et al.* Possible role of HIWI2 in modulating tight junction proteins in retinal pigment epithelial cells through *Akt* signaling pathway [J]. *Molecular and Cellular Biochemistry* ,2017 ,427 ( 1 – 2 ) : 145 – 156.
- Song JJ , Smith SK , Hannon GJ , *et al.* Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity [J]. *Science* ,2004 ,305 ( 5689 ) : 1434 – 1437.
- Tan H , Liao H , Zhao L , *et al.* HILI destabilizes microtubules by suppressing phosphorylation and Gigaxonin – mediated degradation of TBCB [J]. *Scientific Reports* ,2017 ,7 : 46376.
- Vagin VV , Sigova A , Li C , *et al.* A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline [J]. *Science* ,2006 ,313 ( 5785 ) : 320 – 324.
- Valdmanis PN , Gu S , Schuermann N , *et al.* Expression determinants of mammalian argonaute proteins in mediating gene silencing [J]. *Nucleic Acids Research* ,2012 ,40 ( 8 ) : 3704 – 3713.
- Voller D , Linck L , Bruckmann A , *et al.* Argonaute family protein expression in normal tissue and cancer entities [J]. *PLoS ONE* ,2016 ,11 ( 8 ) : e0161165.
- Williams RW , Rubin GM. ARGONAUTE1 is required for efficient RNA interference in *Drosophila* embryos [J]. *PNAS* ,2002 ,99 ( 10 ) : 6889 – 6894.
- Yin DT , Wang Q , Chen L , *et al.* Germline stem cell gene PIWIL2 mediates DNA repair through relaxation of chromatin [J]. *PLoS ONE* ,2011 ,6 ( 11 ) : e27154.
- Zeeba K , Sara P , Mona AB , *et al.* HIWI2 rs508485 polymorphism is associated with non – obstructive azoospermia in Iranian patients [J]. *Reports of Biochemistry & Molecular Biology* ,2017 ,5 ( 2 ) : 108 – 111.
- Zhang K , Lu Y , Yang P , *et al.* HILI inhibits TGF – beta signaling by interacting with Hsp90 and promoting TbetaR degradation [J]. *PLoS ONE* ,2012 ,7 ( 7 ) : e41973.
- Zhao PP , Yao MJ , Chang SY , *et al.* Novel function of PIWIL1 in neuronal polarization and migration via regulation of microtubule – associated proteins [J]. *Molecular Brain* ,2015 ,8 ( 1 ) : 39 – 50.