学校代码： 10289 分 类 号 ： S882.1 密 级 ： 公 开

学 号 ：111310003

**江苏科技大学博 士 学 位 论 文**

**BmCPV 编码的 microRNA 鉴定及其**

**RDRP 基因的 dsRNA 干扰研究**

研究 生姓 名 **潘中华** 导 师 姓 名 **郭锡杰**

申请学位类别 **农学博士** 学位授予单位 **江苏 科技 大 学**

学 科 专 业 **特种经济动物饲养** 论文提交日期 **2015 年** 月 日

研 究 方 向 **家蚕分子病理学** 论文答辩日期 **2015 年 6 月 7 日**

答辩委员会主席 评 阅 人

2015 年 5 月 3 日

**资助项目：**

**国家重点基础研究计划“973”项目（No. 2012CB114600） 江苏省研究生创新基金 CXZZ13-07**

分类号： S882.1

密 级： 公开

学 号 ： 111310003

农学博士学位论文

**BmCPV 编码的 microRNA 鉴定及其RDRP 基因的 dsRNA 干扰研究**

学Th姓名 潘中华

指导教师 郭锡杰

江苏科技大学二O 一五年五月

A Thesis Submitted in Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Agriculture

Identification of BmCPV encoded microRNAs and dsRNA interference on BmCPV RDRP gene

Submitted by Pan Zhonghua Supervised by Dr. Guo Xijie

Jiangsu University of Science and Technology

May, 2015

**江苏科技大学学位论文原创性声明**

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下， 独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外， 本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：

年 月 日

**江苏科技大学学位论文版权使用授权书**

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定， 同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版， 允许论文被查阅和借阅。本人授权江苏科技大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

本学位论文属于：

(1)保密□，在 年解密后适用本授权书。

(2)不保密□。

学位论文作者签名： 指导教师签名：

年 月 日 年 月 日

摘 要

家蚕质型多角体病毒(*Bombyx mori Cytoplasmic polyhedrosis* virus, BmCPV)病，是家蚕的一种肠道型病毒病，在养蚕生产上具有较大的危害性，病原是一种具包涵体的多角体病毒。研究家蚕质型多角体病毒编码的microRNA（miRNA）和RNA干涉（RNA Interfering, RNAi），一方面从miRNA途径探明病毒与宿主的免疫调控关系，从而找到miRNAs调控病毒的靶点；另一方面探索RNAi干扰病毒复制的可行性，对于家蚕病毒病的分子治疗乃至抗病品种的育成具有重要的理论和实际意义。本研究预测了

BmCPV编码的miRNAs，对其中的两条进行了生物信息学分析、鉴定和表达特征检测，初步探索了对病毒本身基因表达的影响；同时研究了双链短RNA（简称dsRNA）对BmCPV-RDRP基因的干扰作用，构建了表达dsRNA的转基因载体。通过本文研究，为进一步探索miRNAs与家蚕基因组互作的关系，miRNAs影响宿主的基因的表达，

miRNAs与BmCPV病毒各分节基因相互作用的细致研究等提供重要的参考价值，同时也为培育抗BmCPV家蚕品种提供了技术依据。现将研究汇报如下。

1. BmCPV能够编码miRNAs。对感染BmCPV的家蚕中肠组织提取总小RNA，通过深度测序建立了小RNA文库，预测获得BmCPV编码的miRNAs。对其中的两条

miRNAs进行生物信息学分析、验证和表达特征检测。表明两条miRNA分别为BmCPV基因组RNA第三片段编码的miR-3（478～497 bp）和第五片段编码的miR-5（2481~2500 bp），大小均为20 bp；在线分析绘制了其二级结构和3-D结构；Stem-loop RT-qPCR和Northern blot两种方法验证，确认了两条miRNAs的存在；表达特征检测进一步表明，miR-3表达量相对较多而miR-5表达较少，家蚕感染BmCPV 5 h后能检测到病毒编码的miRNAs, 24 h后表达量呈上升趋势。研究结果表明BmCPV能够编码miRNA，为进一步深入研究BmCPV编码的miRNAs及其功能奠定了基础。

2. BmCPV编码的miRNAs对病毒本身基因表达具有调控作用。家蚕感染病毒后体腔注射过量miR和Inhibition-miR, RT-qPCR检测病毒基因表达，结果显示，过量

miR能够显著促进病毒部分基因表达。

3. dsRNA对BmCPV-RDRP基因的干扰作用。以家蚕质型多角体病毒依赖于RNA

的RNA聚合酶（BmCPV-RDRP）基因为靶标，设计合成三条dsRNA序列，家蚕幼虫

感染病毒后体腔注射dsRNA, RT-PCR检测靶基因表达。每头5龄蚕注射4～6 ng/mg剂量的dsRNA，能够干扰BmCPV-RDRP基因的表达；注射dsRNA后感染病毒的处理区干扰效率可达93%，而注射dsRNA前感染病毒的干扰效率可达99.9%；同时，检测

BmCPV的二个结构蛋白基因片段（S1、S5），其表达水平随着RDRP基因表达水平降低而降低，推测dsRNA干扰BmCPV-RDRP基因表达能够影响病毒的增殖。

4. 构建了表达dsRNA的转基因载体。克隆家蚕中肠特异性启动子P2，构建了中间表达载体PBM-P2-dsRNA-eGFP，家蚕细胞瞬时转染和RT-qPCR检测，结果表明启动子P2能够表达dsRNA而形成shRNA（small hairpin RNA）；以P2-dsRNA序列为目的基因，基于*piggyBac*转座子构建获得表达dsRNA的转基因载体pig-P2-dsRNA-ploy(A) -eGFP-*neo*，家蚕细胞转染和RT-qPCR检测表明构建的转基因载体能够表达dsRNA。

关键词：BmCPV； miRNA； RDRP； RNAi 转基因载体

**Abstract**

*Bombyx mori* cytoplasmic polyhedron virus BmCPV is a type of silkworm gut virus that poses great dangers in sericulture. Research on the polyhedron virus-encoding microRNA (miRNA) and RNA interference (RNAi) can help clarify the relationship between virus and its host to identify targets for viral miRNA control; on the other hand, it can also help explore the feasibility of using RNAi to disrupt viral replication that may have theoretical and practical significance in viral disease molecular treatment and resistant silkworm strain selection. In this study, we predicted BmCPV-encoding miRNAs, two of which underwent bioinformatic analysis, identification, and expression feature detection to explore preliminarily their impact on viral gene expression; we also investigated the interference of BmCPV-RDRP gene expression by double-stranded RNA (dsRNA) and constructed dsRNA-expressing transgenic vector. This study provides important reference value for further exploration of the relationship between miRNAs and silkworm genome, effects of miRNAs on the expression of host genes, and future detailed studies on the interaction between miRNAs and the genes on sub-sections of BmCPV virus; at the same time, it also provides a technical basis for the breeding of BmCPV-resistant silkworm varieties. The findings of this study are reported as follows.

1. BmCPV encodes miRNAs. Total small RNAs were extracted from BmCPV-infected silkworm midgut, and small RNA library was established by deep sequencing to predict BmCPV-encoded miRNAs. Bioinformatic analysis, verification and expression pattern detection were done for two of the predicted miRNAs. The two miRNAs were miR-3, encoded by the 3rd fragment of BmCPV genome (478 ~ 497 bp), and miR-5, encoded by the fifth fragment of BmCPV genome (2481 ~ 2500 bp), respectively; both were 20 bp and the encoding positions were both in the ORF region; their secondary and 3-D structures were deduced through online analysis; Stem-loop RT-qPCR and Northern blot both confirmed the existence of the two miRNAs; gene expression analysis revealed that miR-3's expression level was relatively higher than miR-5's, and miRNA expression could be detected 5 h after BmCPV infection that started to increase at 24 h. The results indicated that BmCPV is capable of encoding miRNAs, which laid the foundation for further investigations on BmCPV-encoded miRNAs and their functions.

2. BmCPV-encoded miRNAs regulate viral gene expression. After BmCPV infection, high-dose miR and inhibition-miR were injected into silkworms via cavity. High-dose miR led to significantly enhanced expression of some viral genes, as revealed by RT-qPCR detection.

3. DsRNA interferes with the gene expression of BmCPV-RDRP. Three dsRNA sequences were designed based on the gene BmCPV-RDRP encoding RNA-dependent RNA polymerase of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus. The dsRNAs were injected into body cavity after BmCPV infection and RT-PCR was used to measure the expression level of targeted gene. Each five-instar silkworm was injected with 4 ~ 6 ng/mg dsRNA to effectively interfere with the gene expression of BmCPV-RDRP; the interference rate could reach 93% in the treatment zone when dsRNA was injected before the infection, while the rate became as high as 99.9% when the infection was before the dsRNA injection; at the same time, the expression levels of BmCPV structural gene fragments, S1 and S5, were reduced along with decreasing RDRP expression levels. These results indicated that dsRNA interference of BmCPV-RDRP expression affects BmCPV viral amplification.

4. Construction of dsRNA-expression transgenic vector. Silkworm midgut-specific promoter P2 was cloned to construct intermediate expression vector PBM-P2-dsRNA-eGFP. After transient transfection of the vector, P2 was able to promote the expression of dsRNA and formation of shRNA (small hairpin RNA); using P2-dsRNA sequences as target, dsRNA-expression transgenic vector, pig-P2-dsRNA-ploy(A) -eGFP-*neo*, was constructed based on *piggyBac* transposon. Transient transfection of the vector led to expressed dsRNA as revealed by qRT-PCR.

Keywords: BmCPV miRNA RDRP RNAi transgenic vector

目 录

目 录

[摘 要](#_Toc686141765) 3

**[Abstract](#_Toc686141766)** 4

[第一章 绪论](#_Toc686141767) 8

**[1.1](#_Toc686141768)****[BmCPV](#_Toc686141768)**[研究进展](#_Toc686141768) 8

[1.1.1 家蚕质型多角体病毒特征及分类](#_Toc686141769) 8

[1.1.2 BmCPV基因组](#_Toc686141770) 8

[1.1.3 BmCPV生活史](#_Toc686141771) 10

**[1.2](#_Toc686141772)** [家蚕抗](#_Toc686141772)**[BmCPV](#_Toc686141772)**[研究进展](#_Toc686141772) 10

[1.2.1 抗性品种研究](#_Toc686141773) 10

[1.2.2 家蚕对BmCPV的免疫研究](#_Toc686141774) 10

[1.2.3 预防和治疗药物研究](#_Toc686141775) 10

[1.2.4 展望](#_Toc686141776) 10

[1.3 miRNAs概述](#_Toc686141777) 11

[1.3.1 microRNA功能](#_Toc686141778) 11

[1.3.2 MiRNAs实验技术方法](#_Toc686141779) 11

[1.4 病毒编码的miRNA研究进展](#_Toc686141780) 12

[1.4.1 病毒miRNA的特点](#_Toc686141781) 12

[1.4.2 病毒miRNA功能研究进展](#_Toc686141782) 12

[1.4.3 存在的问题和展望](#_Toc686141783) 13

[1.5 RNAi抗病毒研究进展](#_Toc686141784) 13

[1.5.1 RNAi简介](#_Toc686141785) 13

[1.5.2 siRNA的设计、转移和siRNA表达载体的构建](#_Toc686141786) 13

[1.5.3 RNAi抗病毒机制](#_Toc686141787) 13

[1.5.4 RNAi在抗病毒方面的应用](#_Toc686141788) 14

**[1.6](#_Toc686141789)** [本文主要内容](#_Toc686141789) 14

[第二章 一般材料与方法](#_Toc686141790) 14

**[2.1](#_Toc686141791)** [一般材料](#_Toc686141791) 14

[2.1.1 生物材料](#_Toc686141792) 14

[2.1.2 工具酶和所用相关试剂盒](#_Toc686141793) 14

[2.1.3 培养基](#_Toc686141794) 15

[2.1.4 核酸引物和测序](#_Toc686141795) 15

[2.1.5 试剂配置](#_Toc686141796) 15

[2.1.6 常用仪器](#_Toc686141797) 15

**[2.2](#_Toc686141798)** [常用方法](#_Toc686141798) 17

[2.2.1 制备感受态细胞](#_Toc686141799) 17

[1.5 mL塑料离心管内，冰上放置10 min；4℃、12000 r/min×30 s或4℃、5000 r/min×5](#_Toc686141800) 17

[2.2.2 DNA连接的反应体系](#_Toc686141801) 17

[2.2.3 连接产物的转化](#_Toc686141802) 18

[2.2.4 重组质粒的筛选](#_Toc686141803) 18

[2.2.5 采用碱裂解法来制备少量质粒DNA](#_Toc686141804) 18

[2.2.6 DNA目的片段分离和回收](#_Toc686141805) 18

[2.2.7 PCR](#_Toc686141806) 18

[2.2.8 琼脂糖凝胶电泳](#_Toc686141807) 19

[2.2.9 提取总RNA](#_Toc686141808) 19

[2.2.10 RNA反转录cDNA](#_Toc686141809) 19

[2.2.11 定量PCR（Quantitative PCR）冰上配置反应液](#_Toc686141810) 19

[第三章](#_Toc686141811) **[BmCPV](#_Toc686141811)**[编码](#_Toc686141811)**[miRNA](#_Toc686141811)**[的分析和鉴定](#_Toc686141811) 20

[3.1 引言](#_Toc686141812) 20

[3.2 材料与方法](#_Toc686141813) 20

[3.2.1 试验材料](#_Toc686141814) 20

[3.2.2 试验方法](#_Toc686141815) 20

**[3.3](#_Toc686141816)** [试验结果](#_Toc686141816) 21

[3.3.1 从感染BmCPV家蚕中肠小RNA文库中预测miRNAs](#_Toc686141817) 21

[3.3.2 miR验证](#_Toc686141818) 24

[3.3.4 miR靶基因的预测](#_Toc686141819) 26

[3.5 讨论](#_Toc686141820) 28

[3.6 本章小结](#_Toc686141821) 28

[第四章](#_Toc686141822) **[BmCPV-miRNA](#_Toc686141822)**[对病毒本身基因表达调控研究](#_Toc686141822) 28

**[4.1](#_Toc686141823)** [引言](#_Toc686141823) 28

**[4.2](#_Toc686141824)** [材料与方法](#_Toc686141824) 28

[4.2.1 试验材料](#_Toc686141825) 28

[4.2.2 试验方法](#_Toc686141826) 29

[4.3 试验结果与分析](#_Toc686141827) 31

[4.3.1 miR-3和Inhibition-miR-3对BmCPV基因表达的影响](#_Toc686141828) 31

[4.3.2 miR-5和Inhibit-miR-5对BmCPV基因表达的影响](#_Toc686141829) 33

[4.4 讨论](#_Toc686141830) 36

[4.5 本章小结](#_Toc686141831) 36

[第五章](#_Toc686141832) **[dsRNA](#_Toc686141832)**[干扰](#_Toc686141832)**[BmCPV-RDRP](#_Toc686141832)**[基因表达研究](#_Toc686141832) 36

**[5.1](#_Toc686141833)** [引言](#_Toc686141833) 36

**[5.2](#_Toc686141834)** [材料和方法](#_Toc686141834) 37

[5.2.1 试验材料](#_Toc686141835) 37

[5.2.2 试验方法](#_Toc686141836) 37

[5.3 试验结果与分析](#_Toc686141837) 38

[5.3.1 BmCPV-RDRP基因表达特征](#_Toc686141838) 38

[5.3.2 BmCPV基因检测引物的验证](#_Toc686141839) 39

[5.3.3 注射液在家蚕体腔内扩散的模拟实验](#_Toc686141840) 39

[5.3.4 dsRNA对BmCPV-RDRP的干扰效果](#_Toc686141841) 40

[5.3.5 BmCPV-RDRP基因抑制后对病毒基因组其它片段表达的影响](#_Toc686141842) 41

[5.4 讨论](#_Toc686141843) 43

[5.5 本章小结](#_Toc686141844) 43

[第六章 基于](#_Toc686141845)***[piggyBac](#_Toc686141845)***[转座子表达](#_Toc686141845)**[dsRNA](#_Toc686141845)**[转基因载体构建及检测](#_Toc686141845) 44

**[6.1](#_Toc686141846)** [引言](#_Toc686141846) 44

[6.2 材料和方法](#_Toc686141847) 44

[6.2.1 试验材料](#_Toc686141848) 44

[6.2.2 试验方法](#_Toc686141849) 44

[6.3 试验结果与分析](#_Toc686141850) 45

[6.3.1 Bm-P2启动子的克隆和在线分析](#_Toc686141851) 45

[6.3.2 中间载体Bm-P2-dsRNA构建及表达效果检测](#_Toc686141852) 45

[6.3.3 转基因表达载体构建及细胞转染检测](#_Toc686141853) 46

[6.4 讨论](#_Toc686141854) 47

[6.5 本章小结](#_Toc686141855) 47

[结](#_Toc686141856)[论](#_Toc686141856) 47

[参 考 文 献](#_Toc686141857) 48

[附录一](#_Toc686141858)**[Abbreviations list](#_Toc686141858)** 54

# 第一章 绪论

质型多角体病毒属于呼肠孤病毒（*Reoviridae*）、质型多角体病毒属（*Cypovirus*）

[1]，1934年Ishimori等在病蚕中肠细胞中首次观察到[2]。

质型多角体病毒是一种生物农药，宿主较多，大约有250多种昆虫，其中鳞翅目类占80%，16%为双翅目，3%为膜翅目，1%为鞘翅目和脉翅目[3]。昆虫感染质型多角体病毒后，病虫病程较长，能够持续数天乃至数周[4]。质型多角体病毒侵染昆虫中肠细胞，影响昆虫的消化，对作物的保护具有一定的减轻效果；染病昆虫能够通过粪便持续排毒，传染给其它昆虫，使病毒在昆虫群内蔓延而具有长期抑制病虫的效果；病虫病程较长，排毒周期长，病毒数量一直处于增长状态，将一直影响昆虫的整体食下量，对当代作物起到相应的保护效果[5]。但同时质型多角体病毒杀虫剂对昆虫致死时间较慢，需要辅剂甚至速效农药配合使用，增强其药效。

家蚕质型多角体病毒(*Bombyx mori Cytoplasmic polyhedrosis* virus, BmCPV)是质型多角体病毒的一种，宿主范围较广，目前发现可感染20余种不同的昆虫，也是家蚕的一种主要病毒病，常发生于秋季，对养蚕生产造成严重的影响。生产上主要防治措施是依靠加强消毒，淘汰发病蚕等，而对于已经感染和发病的个体，缺乏有效的治疗手段。因此，开展对家蚕质型多角体病毒的microRNA研究和病毒基因的RNAi研究，探明病毒编码的microRNA及调控机理、病原与寄主的特异性关系，分子治疗BmCPV的可行性，对于探索病毒与宿主的调控关系，指导转基因抗病品种的培育及稳定蚕业生产具有重要的理论和实际意义。

## **1.1** **BmCPV**研究进展

### 1.1.1 家蚕质型多角体病毒特征及分类

家蚕质型多角体病毒是有囊膜的双链RNA病毒，基因组大小约25 kb左右，能够感染家蚕[6]。1934年石森记载了该病[7]，1950年Smith和Wycko通过电镜观察到该病原[8]，BmCPV进入了现代病毒学的研究。

家蚕质型多角体病毒感染家蚕中肠上皮细胞，通常在家蚕圆筒状细胞质内形成多角体。其典型的特征是病毒粒子包埋在多角体蛋白晶体结构中，电镜观察显示病毒粒子呈20面体球形对称，大小60-70 nm，沉降系数为415-440 S（图1-1）。余学奎等[9]用负染和冷冻电镜技术以及计算机数据处理方法，观察到BmCPV具有单层衣壳结构，

病毒的5种结构蛋白都位于该单层衣壳上。该单层衣壳按T=1的对称结构排列，在二十面体的顶点具有塔状突起，病毒粒子内包含双链核糖核酸基因组（dsRNA），粒子表面生长12条塔状突起，推测是病毒粒子吸附宿主细胞和病毒核酸进出的通道。

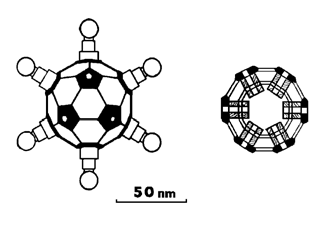


图1-1 BmCPV病毒粒子结构（金伟等. 2001）

病毒具有包涵体，也称多角体(Polyhedra)，电镜下呈六角形、四角形和三角形（图1-2，余学奎等. 1998），在光学显微镜下呈大小不齐，集中成片的特点。多角体病毒大小为0.5-10μm，平均：2.62μm，里面包含1至数万个病毒粒子，多角体对环境有较强抵抗力。



电镜4×104倍光学显微镜400 倍

图1-2 电镜下BmCPV和光学显微镜下BmCPV（余学奎等. 1998）

根据BmCPV的多角体形状，还有在细胞内形成的部位，可将其分为I、H、P、A、

B、B1、B2、C1 和C2 等9 个株系， 其中H 株为野生型， 其它8 个株为突变型[10] ，

### 1.1.2 BmCPV基因组

BmCPV的基因组由10段克分子数相等的dsRNA组成，总相对分子量为20.3×106

Da。研究认为BmCPV基因组编码的结构蛋白(structure protein)存在于纯化的病毒粒子中，主要构成病毒粒子完整的形状；而编码的非结构蛋白(non-structure protein)不出现

在病毒粒子中，仅在病毒的复制、装配等过程中发挥作用。近年来，随着基因组测序技术的不断完善，BmCPV基因组全序列已测定并公布[11]，目前GenBank核苷酸序列数据库中已经公布了BmCPV 两个株系（H株和I株）的全基因序列，Hagiwara K，等

1998年报道S8[12]和S9[13], 2000年报道S6和S7[14], 2001年S5 [15], 2002年S1、S3

和S4[16]等，各基因片段功能基本得到推测（表1-1.）。BmCPV的dsRNA 片段，两端具有保守的序列，10个dsRNA片段的末端相同[17]，一般5′端具有AGTAAA保守序列，3′端具有GTT'AGCC保守序列。其mRNA5′端经过“加冒”和“甲基化”，形成mGPPPAmPGP结构。

表1-1. Properties of BmCPV genome segments and their product proteins（Cao., 2012）

| Segment name and size | Protein name and location | Activity/funtion/homology | Accession No. |
| --- | --- | --- | --- |
| 1(4189 bp) | VP1(Capsid,major) | RRSV P3 (major core capsid protein) | GU323605.1 |
| 2(3854 bp) | VP2 | RDRP | GQ924586.1 |
| 3(3846 bp) | VP3 | RRSV P1, Parvo-like virus minor capsid protein, | GQ924587.1 |
|  |  | Human papillomavirus capsid protein, bacteriophage WO |  |
| 4(3262 bp) | VP4(Capsid,major) | RRSV P2 | GU323606.1 |
| 5(2852 bp) | NSP5 (NS1)[NSP5a | FMDV 2A protease maybe cleaved to two proteins | GQ294468.1 |
|  | (NS2) |  |  |
| 6(1796 bp) | VP6 | ATP/GTP binding pattern leucine zipper motif | GQ294469.1 |
| 7(1501 bp) | VP7 | 7-N-methyltransferase, and 2′-O-methyltransferase | GQ150538.1 |
| 8(1328 bp) | NSP8 (p44) | ssRNA-binding | GQ150539.1 |
| 9(1186 bp) | NSP9 (NS5) | dsRNA-binding | GQ924588.1 |
| 10(944 bp) | Polyhedrin | Polyhedron matrix protein | GQ924589.1 |

BmCPV-1 H株基因组节段10（S10）大小944 bp（M19112），编码248个氨基酸（简称AA）的多角体蛋白。A株S10片段（D37768）与H株一样，大小944 bp，但在第167、342、416及785位核苷酸处碱基不同，并且H株终子密码子是UGA而A株是CGA，A株多角体蛋白的羧末段便增加了Arg2Leu2Leu2Val 4个氨基酸残基[18]。

H株S9（AF061200）和I株S9（AF061199）片段均为1186 bp，编码36 kD的NS5. 仅有6个AA的差异。H株S8（AB016437）和I株S8（AB016436）均为1328 bp，编码分子量为44 kD的p44. I株S7 ( AB030015)长1501 bp、S6（AB030014）为1796

bp，分别编码含有448个AA、561个AA的多肽p50和p64. p64的抗血清能特异性结合病毒结构蛋白VP4，而p50的抗血清在受BmCPV感染的BmN4细胞内特异性地结合VP5. H株S5(AB035733)、I 株S5 （AB035732）均为2852 bp，编码分子量为101 kD p101，位于该多肽219～235位AA处的序列与FMDV的2A蛋白酶（位于

93～109位AA）有82 %的同源率。体外转录分析表明，S5 编码3 种非结构蛋白NS1

（p107）、NS2 (p80)和NS6 (p23 )[19, 20]，提示p101有可能在转录后被类似2Apro的蛋白酶自剪切成p80和p23两种蛋白产物，而未被剪切的p101则被修饰成p107. H

株S4 (AB041008)长度为3259 bp，编码分子量为130 kD 由1057个AA组成的蛋白

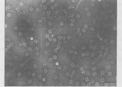
VP3[21]，为衣壳外层蛋白成分之一，其可能具有RNA 鸟苷酰转移酶功能[22]。I株S1

（AF323781）、S2(AF323782) S3(AF323783)、S4（AF323784）四个片段大小分别为4190 bp 、3854 bp、3846 bp和3262 bp，S1可能编码含有1333个AA的蛋白VP1,

S2编码含有1225个AA的RNA依赖性RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)，而S3编码含有1239个AA的多肽，VP1为衣壳外层蛋白的另一成分。

### 1.1.3 BmCPV生活史

BmCPV侵染家蚕中肠圆筒状细胞，在细胞质中形成多角体。孙京臣等在2004年[23]和2006年[24]运用X射线晶体衍射、冷冻电镜及三维重组构建术，描述了病毒粒子对家蚕的侵染过程，认为BmCPV多角体进入家蚕中肠后，在中肠碱性消化液的作用下被溶解，释放出病毒粒子，病毒粒子进入肠腔。通过“布朗”运动或静电吸引，吸附在中肠上皮组织柱状细胞微绒毛表面，病毒dsRNA经病毒粒子的突起注入细胞质，并向细胞核移动，在细胞外留下空壳（图1-3，孙京臣等. 2006）。程凌鹏等[25]在2011年观察到子代病毒核酸在核内复制，转运到细胞质，mRNA“加冒”，病毒粒子和多角体在细胞质内完成装配。CPV转录与复制因脱壳而激活，然后进行单链( Single stranded, ss) RNA的转录，整个转录过程在亚病毒颗粒中进行，由病毒核心携带RdRp聚合酶和其它复制酶的共同作用，以全保留方式进行。



BmCPV感染家蚕1.5h 感染家蚕6h 感染家蚕9h 感染家蚕24h



感染家蚕36h 感染家蚕48h感染家蚕60h 感染家蚕84h

图1-3 BmCPV感染家蚕中肠过程（孙京臣等. 2006）

## **1.2** 家蚕抗**BmCPV**研究进展

### 1.2.1 抗性品种研究

家蚕在品种抗病性上有了一定研究，1979年刘仕贤[26]根据有贺(1959、1961)、鲇泽

（1961、1962、1964）以及渡部（1966）等的研究，认为不同蚕品种间抗BmCPV存在差异，研究了现行品种对BmCPV的抗性，为培育抗性品种提供了研究材料；张志芳等在1986年根据现行品种对BmCPV的自然抵抗力选育抗BmCPV品种，提出了以现实遗传力作为选择效率的一个指标，家蚕对CPV病抵抗性的选择效率，以选择系的选择方法为好[27]。以杂种为材料的抗CPV病选择，发现以大造为亲本的杂种材料进行抗病性选择后，维持了一个以杂合基因型为主的群体。他在1989年分析了抗CPV和抗DNV之间的相关性[28]；廖琼香等从1981年开始培育抗CPV和抗氟品种“研

137×7532·湘晖“[29]；1991年段家龙等提出了抗CPV的选择方法及选择效果，认为东

34品种经7-8代连续添毒质型多角体（CPB）选择，健蛹率提高17.3—54.5％，大造品种经7—8代连续添毒CPV选择，健蛹率仅提高3.9％-5.3％[30]。隔代添毒CPV区的建蛹率和茧质均高于累代添毒选择区；陈萍等[31]1999年分析了抗CPV品种与经济性状之间的关系；徐安英等[32]2002年系统地对281个家蚕品种资源进行了抗质型多角体病毒比较试验，筛选出抗CPV强的遗传品种资源，对未来抗性育种提供了极其宝贵的资料。

### 1.2.2 家蚕对BmCPV的免疫研究

家蚕自生抗病毒机制的研究，近年取得一些进展，吴萍等[33, 34] 2010年采用抑制消减杂交技术构建了家蚕感染BmCPV中肠和正常中肠正反向消减cDNA文库，一些免疫相关基因如丝氨酸蛋白酶抑制剂、脂酶、热激蛋白、细胞色素P450、核糖体P0蛋白等基因的表达水平上调，并对部分基因进行了分析[35]。高坤等[36] 2012年报道了家蚕体内对BmCPV具免疫效果的类胰岛素蛋白，认为家蚕感染BmCPV后，启动本身免疫机制，表达相关蛋白应对BmCPV感染对本身造成的影响。

### 1.2.3 预防和治疗药物研究

目前对BmCPV的相关药物研究基本属于空白，对家蚕病毒病的治疗药物研究，家蚕核型多角体病（BmNPV）研究较多，干扰素、碱基类似物等。尚未有研究BmCPV有效药物的报道。生产上主要采取加强消毒的方式来预防该病，对BmCPV多角体有效的消毒药物，象漂白粉、消特灵、新鲜石灰浆、石灰水加聚甲醛等消毒药剂[37]，对发病群体，则淘汰病蚕，蚕体蚕座消毒，添食抗菌素防止细菌病并发。

### 1.2.4 展望

目前，生产上对于BmCPV引起的家蚕病害尚无有效的防治手段，而同属家蚕病毒病的核型多角体病毒（简称BmNPV），2009年薛仁宇等用RNAi BmNPV增殖的方

法，培育出表达dsRNA抗NPV品种[38]；BmNPV编码的miRNAs的发现，给研究该病又提供了非常好的思路。

BmCPV在RNAi和miRNAs的研究上尚无报道，探索研究BmCPV有效的方法意义重大。

## 1.3 miRNAs概述

MicroRNA（miRNA）是一种长度为21～25 nt的小RNA分子（图1-4, Lau et al., 2001），认为是非蛋白质的新型基因表达调控因子，它们能以序列特异性方式在多种生物学过程中调控基因表达[39]，目前被证明对基因的调控起重要作用。miRNA 首先在细胞核内由编码的mRNA切割成pri-miRNA，然后被RNaseⅢ酶Drosha或Pasha（人类是

DGCR8）切割成pre-miRNA，在exo5的辅助下进入细胞质，pre-miRNA进入细胞质，即被RNaseⅢ的Dicer酶切割生成miRNA双链体，再由RNA解旋酶展开miRNA双链体，它的一条链通过未知核酸酶降解而另一条链装配入RNA诱导沉默复合物。miRNA与靶mRNA互补配对而作为RISC向导，依赖于miRNA和靶mRNA的互补程度，靶

mRNA或被降解或被翻译抑制或表达增强。目前研究表明，植物和少数动物miRNAs调控基因时，序列与靶mRNA完全或接近完全互补配，与siRNA的效应接近，很多研究报道，大部分miRNA与其靶标是不完全互补配对来调控靶基因的表达。



图1-4 microRNA示意图（Lau et al., 2001）

### 1.3.1 microRNA功能

近期研究者对报道的microRNA（又称miRNA）功能进行了总结，推测了几种机制，

来解释大部分miRNA对靶基因的调控功能。目前公开报道的miRNA功能，经过总结，归纳如下。

a. miRNA翻译起始抑制机制

miRNA对翻译起始抑制机制目前主要有3种观点：1. miRNA可能通过抑制全能性核糖体的组装而阻断翻译起始[40]。Thermann等人[41]通过果蝇的miR-2抑制全能性核糖体的前体翻译复合物的组装推测进行了论证；2. 靶mRNA-m7G帽子一般是miRNAs的作用区域，所以有人认为miRISC可能抑制翻译起始，增加eIF4F复合物（2007年Mathonnet G等通过研究发现，增加含有m7G帽子结合蛋白等翻译起始因子，能够解除

miRNA的翻译抑制[42]，此外，miRNA还可能通过阻止polyA结合蛋白（poly A binding

protein，PABP），与mRNA结合从而影响翻译起始。Wakiyama等人[43]发现，miRNA引起靶mRNA脱腺嘌呤反应(deadenylation)，导致mRNA的polyA尾巴缩短，但mRNA的稳定性似乎并不受影响，只是polyA尾巴缩短使PABP结合mRNA受阻，从而影响了翻译起始。

b. miRNA翻译起始后抑制

2006年Nottrott S等[44]研究发现，miRNA处理靶mRNA，发现翻译水平发生下调，推测miRNAs可能引起多肽链的抑制甚至降解，或者是在翻译延伸过程中，miRNA能够诱导翻译提前终止，产生的不完整多肽产物则被迅速降解[45]。

c. miRNA介导mRNA衰减

2008年Wu L等[46]通过研究发现，miRNA能够下调靶mRNA的表达，miRNA与靶mRNA发生不完全配对的方式，下调靶mRNA的表达水平。这种miRNA诱导mRNA下调的作用机制被随后的报道所支持，2007年Giraldez A J等对斑马鱼的早期胚胎发育研究中发现，miR-43能够调控母本mRNA的代谢，表明miRNA介导的mRNA下调机制具有重要的作用，对生物发育将产生巨大的影响[47]。

d. RNA 颗粒扣押、降解或储存靶mRNA 2007年Mazroui R等研究发现，经过诱导的SG颗粒过量添加细胞后，能够减少了P

小体的形成和mRNA衰减[48]。但目前还不清楚miRISC偶联mRNA在过量添加后聚积到SG颗粒中的生理作用是什么。

e. miRNA正调控 miRNAs具有正调控的效应。2007年Vasudevan在Science上首先报道[49]，在一些条

件下，miRNA能够上调基因表达。但Ørom U A在2008年研究了miR-10a正调控基因

表达。发现miR-10a通过结合核糖体蛋白mRNA的5’UTR区域，上调了该基因的表达，刺激核糖体的生成，进而正调控总蛋白质的合成[50]。

### 1.3.2 MiRNAs实验技术方法

miRNA基因及其调控的靶基因的表达，构成了一个非常严密的调控网络，这个网络的精确运行确保了生物体各种生理过程的正常运行[51]。

a. miRNAs的表达检测

2004年Sempere L F等认为，PAGE及Northern blot杂交检测miRNAs是非常有效的方法[52]，经过许多研究者的重复及论证，现在发展成常用的一种方法，PAGE可以有效分离200 bp以内的非编码RNA。而mature-miR和pre-miRNA的长度，均在此范围。Northern blot杂交，通常采用同位素γ-32Ρ2 ATP标记反义寡核苷酸5′末端作为探针，检测灵敏度高而被大家所接受[53]。Northern blot杂交具有许多优点，检测灵敏度高，而且特异性好，基本可排除杂小RNA的污染，而且，根据其杂交斑点大小，基本可估测样品中miRNA的量，绘制已知浓度探针的标准斑点，再将样品反应斑点比较即可[54]。Northern blot杂交后的放射自显影常在20～25 bp区域显示成熟miRNA单一杂交带，有时则出现2条或3条条带，这是由miRNA前体加工过程中剪切位点的细微差别所导致。此外，在70～80 bp位置有时也会出现Pre-miRNA的杂交信号。但PAGE后Northern blot杂交也有缺点，比如对样品的需求量较高，需要微克级样品才能避免假阴性，有时样品量达到40µg才会出现明显杂交信号，这就要求样品量要大，样品量少有时检测不到目标信号。

b. 基因芯片(microarray)

基因芯片是高通量检测miRNA表达情况较好的方法，它可以在短时间内同时鉴定所有已知miRNA的表达谱。最初的miRNA基因芯片，先将反义DNA探针点在尼龙膜上，然后以5′端放射性标记的小分子量RNA样品杂交，再经放射自显影获得信号[55]。目前大多数miRNA芯片都采用荧光检测，采用待测样品与生物素等发光基团直接共价连接（直接标记法），或将标记物在cDNA合成或PCR扩增阶段引入（间接标记法）。很多研究报道利用基因芯片的方法在不同物种的不同器官及组织中，采用差异表达显示，成功获得了miRNA的表达谱。

c. 锁定的核苷酸原位杂交(LNA)

原位杂交（In situ hybridization）将标记的核酸探针与细胞或组织中的核酸进行杂交，

也适用于检测miRNA，是一种了解miRNA时间和组织特异性表达谱更方便的方法。原位杂交曾被广泛应用于mRNA表达的检测，但易发生洗脱过程中丢失，而且miRNA分子较小，改进原位杂交技术意义重大。2006年Kloosterman W P和Neely L A在Nature method上发表研究论文，认为修饰后的寡核苷酸探针与互补的RNA结合后具有很好的双链稳定性[56, 57]。LNA是一种双环结构的RNA类似物，其核糖磷酸骨架上的呋喃环通过一个N型糖苷键（2′- O、4′- C糖苷键）被锁定。一些报道证实，在寡核苷酸探针中每引入1 个LNA 分子，与DNA时杂交可以提高解链温度1℃～8℃，与RNA 杂交时解链温度会提高2℃～10℃。X射线衍射得到的LNA: DNA或LNA: RNA异源双链分子的晶体结构显示，可形成类似RNA双链的A型构象，正是这种构象大大增加了异源双链分子的热力学稳定性。由于LNA探针这种优异的特性，不但miRNA的检测上广泛应用，而且扩展到miRNA的特异性抑制中。2005年Fazi等[58]在*Cell*上发表论文，认为使用LNA修饰的特异寡核苷酸可以互补结合细胞内的mir-223，能够结合mir-223，使其失去原有的功能。此外，还有报道LNA的原位杂交信号主要来源于成熟miRNA分子，而非miRNA前体。随着该技术的进一步改进与完善，它将会被广泛应用于miRNA的定位与抑制研究中。

d. PCR检测miRNA的表达

1) miRNA克隆

cDNA克隆发现和鉴定miRNA基因的方法是目前大部分研究采用的，而且这种方法很有效。miRNA的克隆有多个步骤组成，1.构建small RNA的cDNA文库，即选用专用试剂盒提取待检样品的小RNA；2. 特异性接头引物反转录，在小RNA的5′磷酸基和3′羟基端分别连接上一个已知序列的接头引物，反转录生成cDNA[59]；3. PCR扩增，以特异性的引物进行12个循环的PCR；4. 扩增产物克隆到载体上测序；5. PAGE电泳后Northern blot予以验证[60]。即使用这种方法检测出来的miRNAs，也不能代表全部的miRNAs，很多会被疏忽掉。来源于单个克隆的miRNA很多已经鉴别出来，但不能避免在分离和鉴定过程中因为试剂、操作或一些别的原因未被检测到的miRNAs，来源于不同的组织或细胞，miRNA的实际数量可能会更多。

2) Real-time PCR

Real-time PCR最初被用于定量检测miRNA前体的表达。可以高度灵敏地检测出低丰度表达的靶分子，并适于高通量筛选。PCR扩增前的逆转录反应可以使用随机引物或基因特异的引物。miRNA的PCR引物设计遵循以下几个原则：1. 检测引物一般位于miRNA前体的茎环结构上；2。假设miRNA前体3′或5′端与成熟miRNA相同（允许向假设的miRNA前体末端扩充多至4个核苷酸）；3. 引物长度在18～24 个

核苷酸之间，退火温度在49～59℃之间，3′端不要出现GC等[61, 62]。

3) miRNA抑制

对miRNA功能的研究，一般采用过表达和抑制miRNA的方法，检测基因表达或其他一些生理和病理变化来进行。目前，主要有两种方法可以阻断miRNA的作用：1. 基因敲除对编码miRNA基因敲除或插入碱基引起转录变化，也可以修饰靶基因上的结合位点；2. 竞争性或特异性抑制采用特异性抑制剂来下调miRNA的浓度。目前，

miRNA基因直接敲除的方法并不实用，可能会引起其他问题，如细胞发生变化不适合研究等。所以，很多研究使用2′-O甲基化修饰的反义寡核苷酸链抑制剂，来干扰

miRNA的正常功能[63]。这种抑制剂是体外化学合成，能与特异性miRNA完全互补，又称AMOs（anti-miRNA oligo nucleotides, AMOs），无修饰的反义寡核苷酸链很不稳定，短时间内就降解失效，一般不适合作体外研究。而核糖2′-O的甲基化修饰能保证反义RNA分子在体内的稳定性，有效期有时长达7天。在借助转染试剂进入目的细胞后，能快速并稳定地与内源性mature-miRNA 分子互补结合，从而阻止了内源性

miRNA分子与靶基因配对。目前，这类抑制剂的应用仅限于体外培养的细胞，还不能在动物体内使用。现在，化学合成的2′-O甲基化修饰的寡核苷酸分子可带有一个3′端的氨基接头，用于与非核苷酸分子（例如：生物素等）的连接。这种与标记物相连的寡核苷酸也可用于miRNA的检测，并可用于与miRNA作用的细胞因子的分离[64]。

4) miRNA的过表达

miRNA的过表达，就是细胞或机体中miRNA过量存在对机体或细胞的影响。这是研究miRNA功能的一种重要方式。构建表达miRNA的载体，测试能够表达靶序列后，转染细胞；或体外直接合成miRNA前体或2’-O修饰的miR，转入目的细胞两种方式来实现。前者由于可获得稳定的过表达细胞株而应用较为普遍。在前一种方式中，通常先从基因组中扩增miRNA基因及其旁侧序列，然后将其克隆入逆转录病毒或腺病毒载体，最后感染目的细胞观察功能效应[65, 66]。

## 1.4 病毒编码的miRNA研究进展

近年来已经发现了许多病毒能够编码miRNA，推测病毒也具备这种重要的调控模式。目前已经报道了多种病毒能够编码miRNA，包括7种RNA病毒。病毒侵入细胞编码miRNA过程已经得到推测（图1-5, Kincaid, R. P., 2012）。尽管大多数病毒编码miRNA的功能还未进行详尽的研究，但已经发现一些病毒miRNA参与了细胞毒Ｔ细胞

（cytotoxic T cell, CTL）逃避、潜伏感染介导和凋亡抑制等过程。病毒miRNA

（viralmiRNA, vmiRNA）在致病过程中的作用的探索不仅有助于开发有效的抗病毒

方法，而且还能为研究抗病毒药物提供新的分子靶标[67]。

目前大部分vmiRNA的功能还在研究过程中，已经有研究报道的疱疹病毒属、多瘤病毒属[68]和反转录病毒[69]等多个不同病毒家族的vmiRNAs的功能，或许已经证明，这些vmiRNAs可能对宿主和／或病毒基因实施了调控，从而影响病毒复制和感染过程

[70]. 研究vmiRNA在感染过程中的调控分子机制，将有助于揭示病毒与宿主之间的感染与免疫的关系，可以从这条途径选择抗病毒药物靶点，研究抗病毒新疗法。



图1-5 miRNA biogenesis overview（Kincaid, R. P.,2012）

### 1.4.1 病毒miRNA的特点

vmiRNA前体的长度在60～119 nt之间，平均79 nt，小于植物或动物报道的pre-miRNA，病毒miRNAs的同源性不高，推测vmiRNA可能与进化有关，使其能够适应宿主和环境的不断变化，改善生存环境。通过大量对vmiRNA的研究，发现有其固有特点，如在成熟vmiRNA第一个位置通常是尿嘧啶核苷酸（U），具有高的最低折叠自由能指数（0.9±0.1）。依据这些特点和miRNA的固有特性，增加了成功预测病毒新的vmiRNA的可能性，目前已有许多报道[71]。

RNA病毒也能够编码miRNA，目前仅在少数的逆转录病毒有报道，如人类免疫缺陷病毒（HIV）[72, 73]，牛白血病病毒（BLV）[74, 75]和两个细胞质RNA病毒，即西尼罗河病毒（WNV）[76]和登革热病毒（DENV）[77]，*Ebola*病毒[78]等，在miRNAs功能上也有了一定的研究。

### 1.4.2 病毒miRNA功能研究进展

目前在miRNA功能上研究进展较快，主要功能归纳如下：

a. 逃避细胞CTL反应。CTL是细胞重要的免疫功能，在抗病毒免疫中发挥着重要作用。而病毒为了对付这种功能，通过microRNA途径来实现，如猿猴空泡病毒

（simianvirus40, SV40）编码的miRNA有效下调一组基因表达为逃避CTL对病毒感染细胞的识别和裂解；Sullivan C S等发现SV40 miRNA的表达特征为病毒感染晚期大量表达，与逃避细胞CTL有关。vmiRNA的表达对病毒复制并没有副作用，进一步分析表明这些miRNA几乎完全互补于病毒的早期表达基因并通过干扰将其降解。这些降解基因包括CTL攻击的靶标Ｔ抗原基因，因此，vmiRNA能够伪装病毒感染细胞，并且避免细胞免疫系统识别提供了方便。

b. 潜伏感染

潜伏感染是病毒重要的一个特性，也是病毒能够生存的能力之一，潜伏感染能够在宿主细胞中处于可逆的、非生产性病毒感染的状态。在潜伏过程中，病毒仅表达维持其在细胞中存在所需要最小量的病毒基因，避免宿主免疫系统的攻击。一旦有适当的刺激，如宿主免疫抑制、创伤或暴露于阳光或紫外线照射等，病毒就可以激活，并能进行复制，新产生的病毒粒子再去感染宿主其它的许多细胞。HIV-1编码的miRNA具有调节病毒基因表达方面的作用[79]，

c. 细胞凋亡

细胞凋亡即细胞程序性死亡，是细胞或组织的一种主动死亡方式，也是逃避病毒危害的一种方法。而病毒为了复制，能够通过编码miRNA的方式来抑制感染细胞过早地凋亡。而病毒一旦完成复制后，会促进凋亡来散播子代病毒。病毒抗凋亡策略也有助于病毒逃避CTL和NK细胞对病毒感染细胞的杀伤。单纯疱疹病毒１型编码的一个miRNA能够参与调节TGF-β通路相连的转化生长因子而发生抗凋亡[80]。

d. 调控病毒感染

病毒进化已经采取了miRNA途径的优点，以产生增强成功感染概率的效应。非免疫原性miRNA分子需要最小的基因组资料，这些RNA分子可能在生产性病毒感染中，为病毒提供了调控自身基因和／或宿主基因的有效手段。SV40编码的miRNA已被证明具有调控感染宿主细胞的功能；Dunn 等报道了人巨细胞病毒

（humancytomegalovirus, HCMV）在临床上相关的４种人细胞：成纤维细胞、内皮细胞、上皮细胞和星形（胶质）细胞上，裂解性感染过程中表达了miRNAs。而且，实验室适应毒株和临床分离HCMV均可检测到miRNAs的表达，表明miRNA参与了病毒感染宿主细胞[81]。

### 1.4.3 存在的问题和展望

miRNAs是具有调控基因表达的功能，人类基因中10% ~ 30%受miRNA是的调控

[82]. 病毒也利用miRNAs调节宿主和/或病毒基因表达，以创造病毒复制的良好环境，目前报道的有数百种病毒的编码的miRNAs，但是很多研究表明miRNAs与靶基因作用可以以不完全配对的方式进行，因此，无法预测其确切的靶基因，虽然现在有许多软件预测靶基因，但实际功能可能出入较大，因此多数miRNAs的确切功能还不知道。因此，需要大量确切的实验数据来不断完善各种预测分析软件的准确度。

miRNAs及其靶基因研究发展历史不是很长，随着各种测序技术的发展，各种物种的miRNA发现和靶标数量的上升，病毒与宿主复杂的相互调控和免疫功能会不断被研究，病毒在致病过程中分子机理会逐渐被探明，越来越多可以干扰病毒的药物和新靶标会被发现，miRNAs就是一种新途径。与siRNA和其靶标完全配对不同，miRNAs和其靶标仅需要部分互补，因此能比siRNA更好地应对病毒高频突变。而且miRNAs的高度保守性，特异性将更好。以siRNA设计规则为基础构建的shRNA表达载体，目前研究表明有较好的病毒抑制效果[83]。不少vmiRNAs功能业已探明在病毒感染过程中发挥了巨大作用，阻断试验表明能够对病毒复制产生巨大影响，复制速度大大降低，因此可作为新型抗病毒药物的潜在靶标。Jopling C L等研究认为miR-122是丙型肝炎病毒( hepatitis C virus, HCV )复制必须的一种小RNA[84]. Krutzfeldt等[85]针对miR-122设计的AMOs注射小鼠，结果发现miR-122能够发生降解现象，表明AMOs有希望作为抑制有害miRNAs的潜在工具。

## 1.5 RNAi抗病毒研究进展

### 1.5.1 RNAi简介

RNA干扰（RNA interference, RNAi）是由一种双链RNA（double-stranded RNA, dsRNA）引起的、能够导致序列完全互补的mRNA高效特异性降解的现象（图1-6，章有章，2005，生物化学与分子生物学），它也是体内基因组抵御外在感染和内部转座的一种保护机制，广泛存在于各种生物中[86]。



图1-6. RNAi作用机制（章有章，2005，生物化学与分子生物学）

研究表明，设计与靶mRNA完全互补的双链RNA（dsRNA）导入细胞后，在细胞内Dicer核酸酶的作用下，形成蛋白复合物，与mRNA结合而特异地降解mRNA，从而抑制mRNA的表达。研究中导入的dsRNA多为21～23 nt核苷酸长的小分子干扰

RNA 片段（small interfering RNAs, 简称siRNAs, 又称引导RNAs ），引起的RNAi效应较强。在哺乳动物细胞中，长度大于30 bp的双链RNA可引起非特异性基因沉默现象[87]。

随着对RNA干扰分子机制研究的不断深入，研究者们已发现了RNAi完整的作用通路，许多参与RNAi的基因和蛋白质（酶类）被发现和验证，并证明了RNAi与细胞分化及生物发育密切相关。目前，生物的RNAi作用通路被推测，而且大量的研究表明了RNAi通路的准确性。由于RNAi是一种经济、快捷、高效的抑制基因表达的技术手段，而且有可能在基因功能测定和基因治疗等方面开辟一条新思路，在各方面应用越来越广泛，代替了以前繁琐的基因敲除，可以干扰敲低基因表达，在基因功能研究中发挥了重要作用，同时在药物靶基因的筛选、抗病毒、肿瘤基因治疗等领域有很好的发展前景[88]。

### 1.5.2 siRNA的设计、转移和siRNA表达载体的构建

a. siRNA设计

siRNAs必须与同源mRNA完全配对[89]，才能够发挥作用，不然会发生脱靶或失效的现象。因此，RNAi与靶mRNA 之间的结合能力对作用效果至关重要。因此，

siRNA 的设计时需注意一些事项：a. G-C碱基不超过9 个，GC 含量控制为30%-50 %，

不设计连续4个A或4个T的序列；b.一般反义链5′端用A∶T碱基对；正义链5′端用G∶C 碱基对；c. 设计区域一般在ORF区；（4）设计序列的特异性，BLASTn整个序列，对其他基因无同源序列[90]。但siRNAs在细胞中的作用时间不超过一个星期[91]，所以需构建表达载体而持续稳定表达siRNAs。

b. siRNA表达载体

RNA聚合酶Ⅲ启动子构建表达siRNA是常用的方法之一[92, 93]，表达能力强，表达效果好，U6、H1也是常用启动子，5个T碱基终止子形成的转录表达框，可转录成siRNA或者shRNA (发卡状小干扰RNA，short hairpin RNA)，而发挥作用。

c. siRNA的转移

siRNA需要借助电转导或或阳离子脂质体转染[94]才能进入细胞，直接与细胞共培养不能发挥作用。在生物体内实验中，对鸡胚的研究，可使用电转导将siRNA或其表达载体导入鸡胚神经管[95]、老鼠试验一般采用液体动力注射鼠的尾部静脉[96]等一些方法使siRNA转移 。

### 1.5.3 RNAi抗病毒机制

目前RNAi抗病毒机制主要有以下几种方式

a. 转录后水平上的抗病毒机制

设计的siRNA序列转录后，通过Argonaute家族基因编码的蛋白质的识别后诱导

dsRNA与Dicer酶结合。Dicer酶在ATP的参与下将这个结合物切成长度大约为

21~25 nt的siRNA[97]，与靶mRNA结合达到抑制的作用。

b. 转录水平上的抗病毒机制

针对病毒靶基因结构设计siRNA，使其基因转录受限。病毒在细胞内复制过程中会产生dsRNA复制中间体，作为激活RNAi的作用因子。dsRNA形成后被此时以二聚体形式存在的具有RNA酶III活性的Dicer酶作用。Dicer酶催化结构域在dsRNA上反平行排列，形成四个活性中心。作用过程中，Dicer酶其中只有两侧两个位点具有核酸内切酶的活性，dsRNA在Dicer酶及一些辅助因子的作用下在此处切断，形成长度约为21~25 nt的siRNA。随后，这些siRNA被降解成反义链和正义链，反义链参与形成RISC，成为RNAi的效应物。同时，这些刚形成的siRNA在细胞核可以诱导组蛋白H3的基因及相应DNA的甲基化。当dsRNA含有与启动子同源的序列即可使同源靶启动子序列甲基化，从而使靶启动子失去功能，导致下游基因沉默，转录不能进

行。若甲基化出现在编码区，转录能进行，但在转录后水平上沉默[98]。

c. 翻译水平上的抗病毒机制

设计与病毒mRNA完全互补的siRNA，干扰mRNA的翻译，影响病毒的蛋白质表达。一般针对mRNA 3’末端或5’末端的非翻译区，阻止核糖体与靶mRNA的结合及核糖体的移行，使翻译不能进行，从而抑制病毒复制[99]。

### 1.5.4 RNAi在抗病毒方面的应用

目前，许多病毒性疾病，除了化学药物外，仍然需要更多的治疗方法。RNAi技术的出现可能为病毒性疾病的治疗提供一条较好的途径。近些年来，研究者们在RNAi抗病方面取得了许多突破性的进展。韩晓荣等[100]设计反义核酸免疫基因插入逆转录表达载体，表达siRNA抑制口蹄疫病毒(foot and mouth disease virus, FMDV)的复制。Chen等[101]以人的重组腺病毒为载体来表达siRNA，在细胞水平上抑制了FMDV的复制。在治疗禽流感(avian influenza virus, AIV)方面，RNAi技术同样可以发挥作用。张伟等[102]设计并合成3对靶向HPAIV NP基因的siRNA，构建表达性质粒（ps-NP732、ps-NP863、ps-NP1344），分别转染MDCK细胞并攻毒，通过病毒滴度测定、real-time PCR、间接免疫荧光试验和Western blot，检测siRNA抑制AIV复制的效果。结果设计的3对siRNA中，ps-NP863明显抑制AIV复制，病毒滴度与对照组相比降低31倍，real-time PCR、间接免疫荧光试验、Western blot结果与病毒滴度测定结果相符，而ps-NP732和ps-NP1344无抑制AIV复制作用。为以后研制AIV疫苗奠定了基础。Zhou等对禽流感病毒siRNA研究表明，细胞水平抗病毒效果较好，能够使感染病毒后鼠的LD50发生下降，但结果显示，降低幅度较小；小鼠感染病毒后导入干扰序列，能够降低小鼠肺部的病毒滴度。

类似的研究在HIV病毒，肝炎病毒等许多病毒取得了许多重大进展。RNA干扰作为一种古老而又天然的调控机制，已引起许多研究者的重视。作为一种非常好的研究方法，通过各种方案，影响病毒复制，筛选最有效的方法，走向实用化提供了好的途径，同时也是研究基因功能的常用方法之一[103]。siRNA研究进展较快，但还有很多问题没有得到很好地解决，例siRNA转移，对病毒的特异性，对机体的副作用等问题。另外，一些病毒的RNA沉默逃逸是一个非常大的问题，一旦这些基础问题得到解决，大大加快RNAi 抗病毒走向临床应用[104]。

## **1.6** 本文主要内容

1.6.1预测与鉴定BmCPV编码的miRNA，分析其在家蚕感染BmCPV后的表达特征；

1.6.2采用蚕体注射单链miR的方法，研究BmCPV编码的miRNA对病毒本身基因的表达调控；

1.6.3研究dsRNA干扰BmCPV-RDRP基因的可行性，设计并验证具有干扰作用的

dsRNA；

1.6.4克隆家蚕P2启动子，构建基于*piggyBac*转座子的表达dsRNA的转基因载体，用于抗病毒转基因研究。

# 第二章 一般材料与方法

## **2.1** 一般材料

### 2.1.1 生物材料

a. 家蚕：P50，菁松×皓月（中国农科院蚕业研究所病理室保存、饲养）。

b. 病毒：BmCPV多角体（中国农科院蚕业研究所病理室保存、复壮）。

c. 载体：pMDTM19-T 载体购自大连宝生物有限公司(TaKaRa)；*piggyBac*转座子和

*helper*质粒由苏州大学贡成良教授提供。

d. 菌种：*Escherichia coli* TG1菌株由中国农科院蚕业研究所病理室研究室保存。

### 2.1.2 工具酶和所用相关试剂盒

T4连接试剂盒、rTaq、缓冲液、2 x Sybr Green qPCR Mix以及ROX Reference Dye、

DNA凝胶回收试剂盒、100 bp DNA marker、各种快切酶均购自北京博凌科为生物科技有限公司。

AxyPrepTM PCR Cleanup Kit购自美国AXYGEN公司。

miR检测试剂盒，siRNA检测试剂盒购自上海吉玛生物制药有限公司

Trizol Invitrogen, 美国

Streptavidin-HRP Conjugate碧云天，上海

BeyoECL Plus Reagent A碧云天，上海

BeyoECL Plus Reagent B碧云天，上海

琼脂糖赛百盛，北京

杂交液碧云天，上海

### 2.1.3 培养基

a. LB 固体培养基：每1000 mL LB液体培养基中加14.0 g琼脂粉，灭菌后冷却至大约

50℃，加入1/1000的体积卡那/氨苄抗生素，铺置平板。

b. LB液体培养基：5g酵母的抽提物，10 g胰蛋白胨，10g NaCl，去离子水定容为1 L，每个试管分装5 mL，121℃的温度高压湿热灭菌30 min，低温保存。

### 2.1.4 核酸引物和测序

核酸引物均由上海生物工程有限公司合成，设计的单链miR、anti-miR和dsRNA

由上海吉玛制药有限公司合成，DNA探针Genewiz，天津赛尔生物有限公司。基因片段测序均由上海生物工程有限公司完成。

### 2.1.5 试剂配置

#### 2.1.5.1 分子克隆实验相关溶液的配置

a. 抗生素溶液的配置

氨苄青霉素（ampicillin, Amp）：

将氨苄青霉素溶于水（灭菌水）中，配制为100 mg/mL，-20℃贮存。

b. 质粒抽提缓冲液（碱变性法）：

溶液Ⅰ：2 mL 0.5 mol/L(pH 8.0) EDTA缓冲液、0.99 g葡萄糖、1.25 mL 2 mol/L Tris·Cl(pH 8.0)贮存液，去离子水定容至100 mL，121℃的温度高压灭菌30 min，冷却后加入1 mL Rnase酶，4℃冰箱保存。

溶液Ⅱ：1g十二烷基磺酸钠（SDS）、0.8g NaOH，去离子水定容至100 mL，室温保存。室温较低时，十二烷基磺酸钠（SDS）析出，注意：使用前需稍微加热直至晶体完全溶解。

溶液Ⅲ：冰乙酸11.5 mL，乙酸钾5 mol/L，去离子水定容至100 mL，4℃冰箱保存。

c. 5×TBE缓冲液的配制

27.5 g硼酸，54 g Tris碱，20 mL 0.5 mol/L EDTA（pH 8.0）（四乙酸二氨基乙烷），定容至1000 mL，121℃高压湿热灭菌30 min，室温保存；TBE工作液浓度为

0.5×。

d. 1×TE（Tris/EDTA）缓冲液的配制

1 mmol/L EDTA(pH 8.0)、10 mmol/L Tris·Cl（pH 8.0），即0.5 mol/L (pH 8.0)

EDTA缓冲液1 mL，1 mol/L Tris·Cl(pH 8.0) 5 mL，用去离子水定容至500 mL，121℃高压湿热（条件）灭菌30 min，室温保存。

e. 其它的相关试剂的配制

10 % SDS（十二烷基磺酸钠）(m/v)：用80 mL去离子水将10 g SDS粉末完全溶解，冰醋酸调pH值至5.2后定容至体积100 mL，室温贮存。

CaCl2（75 mmol/L）溶液的配制：无水CaCl2 0.825 g，以去离子水完全溶解混匀，定容至100 mL，121℃高压湿热灭菌30 min后4℃保存。

1 %琼脂糖凝胶：将1 g琼脂糖（电泳级）加入100 mL 0.5×TBE缓冲液，微波炉加热直至完全溶解后，冷却至大约50℃左右，再加入5μL 10 mg/mL浓度的EB混匀即可制成1%琼脂糖凝胶。

X-gal（2 %, m/v）：用二甲基酰胺(dimethylformamide)溶解5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷来配制浓度为20 mg/mL的贮存液。配制完成后，用锡纸包裹，-20℃贮存。10 mg/mL EB（溴乙锭）：用去离子水溶解0.1 g溴乙锭固体，定容至体积为10 mL，锡纸包裹，室温下阴暗中保存。

0.5 mol/L EDTA（pH 8.0）缓冲液：186.1 g EDTA-Na2•2H2O以800 mL去离子水完全溶解，NaOH碱性试剂调溶液的pH值至8.0，定容至体积为1L，室温保存。

1 mol/L Tris•Cl（pH 8.0）贮存液：800 mL去离子水溶解121 g Tris碱，浓盐酸调溶液调节pH值至8.0，定容1L，室温情况下保存。

1 mol/L IPTG：用8 mL去离子水完全溶解2.38 g IPTG，再定容至10 mL，0.22μm的滤膜过滤除菌和分装，-20℃贮存备用。

### 2.1.6 常用仪器

本研究所用仪器见表2-1。

表2-1 本研究常用仪器

| 仪器 | 型号 | 生产商 |
| --- | --- | --- |
| 立式压力蒸汽灭菌器 | LDZX-50KB | 杭州奥盛仪器有限公司 |
| 超低温冰箱 | ULT1786-6-V49 | 美国 Thermo Scientific |
| 恒温金属浴 | K20 | 上海申安医疗器械厂 |
| 凝胶成像系统 | GIS-2007 | 上海天能科技有限公司 |
| 优普超纯水机 | UPT-Ⅲ-5T | 成都超纯科技有限公司 |
| 紫外透射分析仪 | KH-UV1 型 | 重庆四达实验仪器有限公司 |
| 1/10000 分析天平 | BS124S | 北京赛多利斯仪器系统有限公司 |
| Real-time PCR | ABI PRISM 7300 | 罗氏诊断产品（上海）有限公司 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 落地式冷冻离心机 | CF15D2 | 日本 Hitachi 公司 |
| 超声波清洗器 | KQ-500DB | 日本 Hitachi 公司 |
| 台式空气恒温振荡器 | QYC200 | 上海福玛实验设备有限公司 |
| 核酸电泳仪 | DY-A | 上海西巴斯生物技术有限公司 |
| 电热鼓风干燥箱 | CS101-3EB | 上海康禾光电仪器有限公司 |
| 台式冷冻离心机 | Z283K | 德国 Hermle 公司 |
| 生化培养箱 | SHP-250 | 上海ft连实验设备有限公司 |
| 紫外分光光度计 | UV3000 | 昆ft市超声仪器有限公司 |
| PCR 仪 | TP600 | 大连宝生物工程有限公司 |

## **2.2** 常用方法

### 2.2.1 制备感受态细胞

灭菌的接种棒蘸取*E. coli* TG1菌株的菌液，在LB平板的表面上轻轻的划线（“Z”形连线）分离单菌落，37℃倒置培养过夜；次日从LB平板上挑取单菌落，接种到3 mL

LB的液体培养基中，37℃下震荡培过夜培养；吸取30μL培养液接种1.5 mL LB培养基，37℃震荡培养3h后，液体稍显微微浑浊，将制得的*E. coli* TG1菌株培养液转入

## 1.5 mL塑料离心管内，冰上放置10 min；4℃、12000 r/min×30 s或4℃、5000 r/min×5

min，离心后弃上清（将Ep管倒置，清空里边残留的液体）；加入预冷的75 mmol/L氯化钙（CaCl2）750μL，用移液枪轻轻吹起并悬浮细胞，冰上放置30 min后4℃、12000 r/min×30 s或4℃、3000 r/min×8 min，去除上清液；加入预冷的200μL 75 mmol/L CaCl2，轻轻悬浮沉淀物，在冰上放置至少5 h，即可制成感受态细胞，将制备好的感受态细胞放在-80℃超低温冰箱中保存，以备使用。

### 2.2.2 DNA连接的反应体系

25μL离心管中，参照表2-2所列试剂混匀（总体系体积为10μL），16℃温浴过夜

（约8~12 h）。

表 2-2 DNA 连接反应体系目的基因片段 4.5 μL 10×T4 ligase buffer 2 μL

载体 0.5 ul

T4 DNA ligase 1 μL

无菌水 2 μL

### 2.2.3 连接产物的转化

吸取100μL感受态细胞悬浮液，加入10μL连接液，轻轻的充分混匀，放置在冰上30 min；然后放在42℃金属浴热击42 s（时间非常关键），迅速放在冰上2 min，加入1000μL LB培养基，置于37℃摇床1 h，使细胞恢复到正常生长状态；4℃、12000

r/min 离心30 s后，菌液浓缩至200μL（去上清，大约留200μL），均匀涂板（轻轻的涂，避免破坏培养基），涂布在含Amp、IPTG、X-gal的LB固体培养基上，在37℃的环境中正面放置30 min，待菌液被培养基吸收完全后，倒置过夜培养。

### 2.2.4 重组质粒的筛选

重组质粒筛选采用常规蓝白斑方法，挑取10个相对独立的白色单菌落，分别接种含3 mL Amp的液体培养基，37 ℃震荡混匀培养过夜（大约12 h）；试剂盒制备少量质粒DNA；琼脂糖凝胶电泳中质粒条带迁移到凝胶中部以后，仔细分析迁移率的不同，选取迁移率较慢的质粒在进行进一步鉴定和分析。

### 2.2.5 采用碱裂解法来制备少量质粒DNA

a. 挑转化后单菌落，分别接种在3 mL含千分之一Amp的LB培养基，37 ℃、180 r/min

震荡过夜培养（约8 h）。

b. 用移液枪将1 mL培养物转移1.5 mL离心管中，4℃、12000 r/min离心30 s。

c. 离心结束后，移液枪吸光所有的培养液。

d. 将细菌沉淀重悬在250μL冰中预冷的溶液Ⅰ，为了使细胞悬浮，剧烈的振荡。

e. 加入新配制的溶液Ⅱ250μL，轻轻颠倒离心管5～7次来充分混合溶液，直至离心管的溶液透明呈粘稠状态。

f. 加入冰预冷的溶液Ⅲ350μL，迅速颠倒离心管数次，以充分混合溶液，然后在冰上放置10 min。

g. 离心管置于低温离心机，4℃、12000 r/min离心10 min。

h. 将上清液转移到吸附住，4℃、12000 r/min离心1 min。

i. 加入750μL洗涤液12000 r/min离心1 min。

j. 加入500μL洗涤液，4℃、12000 r/min离心1 min。

k. 离心管置于低温离心机，4℃、12000 r/min离心2 min。

l. 离心管敞开静止2 min。

m. 加入100μL洗脱液EB、12000 r/min离心1 min。

n. 制备好的质粒-20℃保存备用。

### 2.2.6 DNA目的片段分离和回收

按照gel extraction kit的说明书操作实验，-20℃温度下保存备用。

### 2.2.7 PCR

a. 在25μL离心管中，参照表2-3.所列试剂混匀。

表2-3 PCR反应体系

总体积：25μL

10×PCR buffer(Mg2+) 2.5μL

dNTP混合物（每种2.5 mmol/L）1μL

模板 DNA 1 μL

primer1 0.5 μL

primer2 0.5 μL

Taq DNA 聚合酶 0.25 μL

ddH2O 19.25 μL

b. 将反应管放进PCR仪中进行反应，按照具体的引物设计循环条件。一般的实验条件为：

95℃ 预变性 4 min

94℃ 变性 30 sec

60℃ 复性 30 sec 35 cycle

72℃ 延伸 1 min

72℃ 再延伸 10 min

c. 待反应完全完成后，取8μL的量进行电泳鉴定。

### 2.2.8 琼脂糖凝胶电泳

根据分离的DNA片段大小，用0.5×TBE配制的适当浓度琼脂糖凝胶（注意是0.5，要稀释溶液），在微型电泳槽的制胶板上跑胶，凝固后取适当的样品与10×上样缓冲液buffer（约1μL）混合后上样，电泳缓冲液为0.5×TBE，电压为90 V，20 min电泳后在紫外透射仪中观看并用仪器曝光取照。

### 2.2.9 提取总RNA

总RNA提取试剂盒（购自北京博凌科为生物科技有限公司）提取。

### 2.2.10 RNA反转录cDNA

100 ng/μL总RNA，1μL；0.1μg/μL Random Primer, 1μL；10 mM dNTP Mixture, 1μL；5×RT Buffer, 4μL；40 units/μL Rnase Inhibitor, 0.5μL；TUREscript H- Rtase, 1μL；RNase free H2O, 11.5μL；混匀25℃孵育10 min，42℃孵育50 min；然后70℃灭活逆转录酶5 min。

### 2.2.11 定量PCR（Quantitative PCR）冰上配置反应液

2 x SYBR qPCR Mix 10μL

DNA Template 0.8μL

Forward Primer 0.4μL

Reverse Primer 0.4μL

ROX (已稀释) 1μL

DdH2O final volume 20μL

仪器设置

50℃ 2 min

94℃ 1 min

94℃15 sec

60℃31 sec

添加步骤 4

45 cycle

总体系20μL，并设置在退火阶段采集荧光信号。

# **第三章** **BmCPV**编码**miRNA**的分析和鉴定

## 3.1 引言

miRNA是一类长度为21～25nt非编码的小RNA，它们能以序列特异性方式在多种生物学过程中调控基因表达。研究发现多种病毒能够编码miRNA，表明病毒存在这种调控模式。大部分vmiRNAs的功能还不知道，DNA病毒类的疱疹病毒属、多瘤病毒属的vmiRNAs的功能已经证明或提出，这些vmiRNAs可能对宿主和／或病毒基因实施调控，从而影响病毒复制和感染过程。一些RNA病毒，人类免疫缺陷病毒（HIV），牛白血病病毒（BLV）和两个细胞质RNA病毒，即西尼罗河病毒（WNV）和登革热病毒（DENV），*Ebola*病毒等，也能够编码miRNAs，在miRNAs功能上也有了一定的研究。深入研究vmiRNAs在病毒感染过程中的作用，将有助于揭示病毒组织嗜性和致病机理，从而为抗病毒药物靶点的选择和抗病毒新疗法的开发奠定基础[105]。

家蚕质型多角体病毒病，是养蚕生产上具有危害性的蚕病。该病原是一种具包涵体的多角体病毒，病毒通过家蚕食下感染，侵染中肠圆筒状细胞，在细胞质中形成多角体，导致细胞破裂，病毒多角体通过粪便排出体外，感染其它健康个体，形成严重的蚕座传染，蚕儿感染病毒后，正常消化功能受到影响，造成家蚕发病，对蚕桑生产造成威胁的特性。

BmCPV的基因组由10段克分子数相等的dsRNA组成，总相对分子量为20.3×106

Da。随着基因组测序技术的不断完善，BmCPV型基因组全序列已测定并公布，各片段主要功能均被推测报道。BmCPV与人类和动物的Norovirus病毒[106]同属肠道型RNA病毒，缺乏能够培养的细胞，研究手段有限。

目前未见BmCPV编码miRNA的报道，本实验室对BmCPV感染家蚕中肠组织后提取总小RNA，通过深度测序建立了小RNA文库，预测BmCPV编码的miRNA。本文研究的目的是证实BmCPV能够编码miRNA，并对其进行生物信息学分析，其次探索BmCPV编码的miRNA感染家蚕后的表达特征及对宿主和病毒的靶基因预测。研究结果可为进一步研究BmCPV的miRNA与宿主相互关系、对病毒复制的影响等功能提供技术参考。

## 3.2 材料与方法

### 3.2.1 试验材料

一般材料参见第二章一般材料

### 3.2.2 试验方法

#### 3.2.2.1 BmCPV感染家蚕小RNA文库建立和测序

家蚕感染BmCPV的小RNA文库的构建和测序已经发表[107]，简单叙述如下，按照试剂盒的说明书，使用TruSeq小RNA样品制备试剂盒和测序试剂盒进行小RNA文库的构建和深度测序（Illumina公司, CA）。从感染BmCPV家蚕中肠中抽提的总RNA 4 mg，先连接Illumina的3’RNA Adapter，再连接5’RNA Adapter，然后进行逆转录，再进行12个循环的PCR扩增，扩增产物进行PAGE胶电泳，切胶回收145~160 bp范围的条带，得到pair-end文库。通过Agilent 2100 High Sensitivity Chip质控片段大小，以及用KAPA qPCR试剂盒质控文库准确nM浓度，最后取10µL，2 nM的文库，在

cBot中进行簇生成（cluster generation），然后在IlluminaGAⅡX测序仪上进行单向测序，通过33个循环的测序反应，得到33 bp的原始读长数据。Solexa测序数据去除两端的接头序列，所得序列去除低质量、空标签及小于18 bp和大于31 bp的序列，得到唯一序列的文库。对比的基因组，家蚕基因组参考（SilkDB，

[http: //silkworm. genomics. org. cn/)](http://silkworm.genomics.org.cn/))、BmCPV基因组参考曹广力等的报道，分别使用

Bowtie软件进行对比[108]，将完全匹配到基因组上的读长序列与miRBase(Release19.0)中该物种的microRNA前体序列进行比对来鉴定已知的miRNA；得到miRNA的成熟体和前体的相关信息，按照两个标准筛选已知的miRNA：（1）测得的序列必须与预测前体序列完全匹配，（2）对比序列起始位置与成熟前体差异在两个碱基之内。将完全匹配到基因组上的读长序列与miRBase(Release19.0)中动物成熟的microRNA序列进行比对，允许2个错配，来鉴定保守的miRNA[109]。

识别新的miRNAs，去除不编码的RNA (rRNA, tRNA和snoRNA, etc)、重复序列和低丰度序列，也包括来自同一前体产生的含量较少的miR，确定后，对剩下的序列在基因组位置两翼超过150 nt。这种方法被用来避免重复预测，基因组片段被定义为

“'blocks”。对于每个块，序列的上游和下游150 nt进行二级结构分析，参考

Jones-Rhoades和Bartel的方法[110]，用Emboss软件进行序列分析，寻找反向重复序列（茎环或发夹结构），条件设置，参数阈值=45，匹配得分=3，错配得分=3，空隙扣分=7和最大重复长度=240，之后每个反向重复序列每侧延伸10 nt，反向序列的二级结构预测用RNAfold软件[111]，参考MirCheck的方法，采用改进的参数筛选剩余的反向重复序列($MAX\_STAR\_UNPAIR=8; $MAX\_SIZEDIFFERENCE= 3; $MAX\_MIR\_GAP= 4; $MAX\_STAR\_GAP= 4)。

BmCPV编码的两条miRNA，[http: //blast. ncbi. nlm. nih. gov/分析其编码位置，](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/%E5%88%86%E6%9E%90%E5%85%B6%E7%BC%96%E7%A0%81%E4%BD%8D%E7%BD%AE)参考Zhao, Y.等[112]的方法，[http: //rna. tbi. univie. ac. at/cgi-bin/RNAfold. cgi 预测绘制其二级结](http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi%E9%A2%84%E6%B5%8B%E7%BB%98%E5%88%B6%E5%85%B6%E4%BA%8C%E7%BA%A7%E7%BB%93)构，[http: //122.205.6.127/3dRNA/3dRNA. html 预测绘制其三级结构，](http://122.205.6.127/3dRNA/3dRNA.html%E9%A2%84%E6%B5%8B%E7%BB%98%E5%88%B6%E5%85%B6%E4%B8%89%E7%BA%A7%E7%BB%93%E6%9E%84)[http: //www. mirbase. org/cgi-bin/blast. pl 寻找序列相似、公开报道的成熟](http://www.mirbase.org/cgi-bin/blast.pl%E5%AF%BB%E6%89%BE%E5%BA%8F%E5%88%97%E7%9B%B8%E4%BC%BC)miRNA[113]。

#### 3.2.2.2 BmCPV编码的miRNA验证

a. 病毒感染与中肠收集

病毒感染家蚕和中肠收集参考吴萍等的方法，BmCPV 病毒多角体灭菌水配置成

1×108个/mL。160μL病毒液涂布在3 cm2圆形桑叶片上，稍干后供两头5龄起蚕食用，高剂量组每头蚕食下约8×106个多角体；低剂量组将病毒液稀释5倍后使用，每头蚕感染多角体约16万粒。对照未感染组添食0.9 % NaCl，分别于感染5 h、24 h、48 h、72 h和96 h解剖取家蚕中肠，每次取10头家蚕中肠作为一个检测样品。

感染病毒和对照组的家蚕在冰上解剖中肠，分离后的中肠用0.9% NaC1洗去残桑和附着组织后浸入DEPC溶液，置于液氮保存。

b. 病毒RNA提取

从感染BmCPV家蚕幼虫分离的中肠中提取总RNA，选用病毒RNA提取试剂盒，按照说明书操作，提取的总RNA置于-80℃保存备用。

c. Stem-loop RT-qPCR分析

1）. Stem-loop RT-qPCR检测方法验证：

Stem-loop RT-qPCR检测方法验证参考Kramer等[114]的方法，感染BmCPV家蚕中肠，试剂盒提取总小RNA，10倍梯度稀释后Stem-loop RT-qPCR，验证检测方法可行性。

2）. Stem-loop RT-qPCR验证miR和BmCPV-miR表达特征检测：

家蚕感染病毒的中肠提取总小RNA, Stem-loop RT-qPCR验证miR及家蚕感染

BmCPV后miR的表达特征检测。

3）引物和反应条件

Stem-loop RT-qPCR检测引物RT-primer和primer set参考吴萍等的设计及Northren blot检测引物为荧光标记的互补序列（表3-1.），由上海吉玛生物制药有限公司合成。

Stem-loop RT-qPCR检测病毒miR，采用两步法，按照试剂盒说明书操作，设置条件如下：冰上配置反应液2 x SYBR qPCR Mix 10μL, DNA Template 0.8μL, Forward Primer 0.4μL, Reverse Primer 0.4μL, ROX (已稀释) 1μL, ddH2O终体积20μL。

反应条件，50℃2 min，94℃1 min，94℃15 s，60℃31 s。

表 3-1 预测BmCPV-miRNA的RT-primer和primer set引物(下划线为通用序列) RT-primer(5'to3') Primer set(5'to3')

BmCPV-miR-3 CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATT

CAGTTGAGACTCAATT

BmCPV-miR-5 CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATT

CAGTTGAGGCCCTTAA

ACACTCCAGCTGGGTATCTT

GATCGTAA ACACTCCAGCTGGGTGAATT TGCTCGTT

URP TGGTGTCGTGGAGTCG

BmCPV-miR-3探针ACTCAATTACGATCAAGATA

BmCPV-miR-3探针GCCCTTAACGAGCAAATTCA

d. Northern blot分析

家蚕感染病毒的中肠提取的总小RNA，采用紫外分光光度法测定RNA在260 nm和280 nm的吸光度，计算RNA含量(260 nm的OD＝1相当于RNA含量40g/mL)，富集A260／A280的值均在1.8-2.1范围内的miRNA。取1µg样品，进行1％琼脂糖电泳。80V，10-15 min。变性胶配方：总体积30 mL，浓度15%: PAGE 11.2 mL, DEPC水5.5 mL，10×TBE 3 mL，尿素14.4 g, 10% AP 120μL, TEMED 10μL。每个泳道上样量10μg～50μg。电泳电压：150 V，当溴酚蓝跑到约3/5停止。采用电转法转膜，电流3.3 mA/cm2，当电压达到20 v后30 min结束。地高辛标记的荧光探针杂交[115]，验证miR及表达特征检测。实验由天津赛尔生物有限公司完成。

#### 3.2.2.3 病毒miRNAs靶基因预测

BmCPV编码的miR，预测病毒及宿主的靶基因，参考2011年吴萍等的报道，感染BmCPV家蚕中肠24 h、48 h和72 h的差异基因共318个，包括家蚕感染病毒后的应急反应基因。SilkDB下载家蚕mRNA序列，建立家蚕感染BmCPV差异基因表达文库，RNAhybrid 2.2软件分析，条件设置：miRNAs: mRNA的ΔG<20 kcal/mol，其它条件默认系统自动设置。预测的靶基因，以miR第2到第8个碱基为“种子区”序列，靶基因与之没有错配，对比序列空隙不超过2个，对靶基因进行筛选[116]。

病毒基因参考2012年曹广力等报道的BmCPV基因组。

## **3.3** 试验结果

### 3.3.1 从感染BmCPV家蚕中肠小RNA文库中预测miRNAs

对感染BmCPV家蚕中肠提取小RNA进行深度测序，以家蚕基因组为对比序列，得到316条已知的miRNAs和90条新的miRNAs，感染BmCPV家蚕中肠和未感染对照组有

58条差异表达miRNAs，(P value = 0.01, 均价变化= 2.0 or = 0.5)细节见Wu et al.,

2013）. 同时，用BmCPV基因组作对比序列，预测了两条miR和相应前体，两条miRNA测序信息，mature-miR见表3-2，pre-miRNA测序信息见表3-3。在线[http: //blast. ncbi. nlm. nih. gov/分析，结果显示，序列](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/%E5%88%86%E6%9E%90)1及其前体编码位置在BmCPV-S5片段（GQ294468.1）（图3-1）2481～2500 bp处，大小为20 bp，命名为miR-5；而序列2及其前体编码位置在BmCPV-S3片段（GQ924587.1）478～497 bp处（图3-2），大小为20 bp，命名为miR-3 [117]。在线序列比较分析显示，BmCPV编码的两条miR均在基因的ORF区域。

表3 -2：两条成熟-miRNAs测序详细信息

| 信息目录 | 序列 1 | 序列 2 |
| --- | --- | --- |
| id | 3268 | 24681 |
| length | 20 | 20 |
| mature-miRNA | TGAATTTGCTCGTTAAGGGC | TATCTTGATCGTAATTGAGT |
| strand | + | - |
| start | 30013 | 51847 |
| seq | TGAATTTGCTCGTTAAGGGC | ACTCAATTACGATCAAGATA |
| energe | 0 | 1 |
| mismatch |  | 10:T>C |
| end | 30038 | 51872 |

表3-3 两条pre-miRNA测序信息

| 前体预测信息 | 序列 1 | 序列 2 |
| --- | --- | --- |
| X.Number | 404 | 2107 |
| X.Name | MD214\_S1 | MR311\_R1 |
| X.Orient | D | R |
| X.Class | MS | RM |
| X.Start | 29989 | 51808 |
| X.Size | 75 | 72 |
| X.Rscore | 174.9428 | 130.299 |
| X.Bscore | 90 | 72 |
| X.Energy | 0 | 0 |
| X.windows\_count | 40 | 38 |
| X.ApexPos | 39 | 33 |
| end.1 | 30064 | 51880 |
| pre-miRNA | TATCGTACTGGGTGCAAGGCAGT AATGAATTTGCTCGTTAAGGGCG ACTTAGTGAGATTGCCATGCGGT ATGATA | ACATGTAACTCAACATCACCG CTATCTTGATCATAATTGAGTA TCTCAATGACTAGATTAAATGA  TTGAAAGTGTGGTGTTGTCGC TGT |

5'- 3'-



3846bp

MiR-3:478～497 bp

图3-1. BmCPV-miR-3 and mir-3编码位置



5'- 3'-

2852bp

MiR-5: 2481~2500 bp

图3-2. BmCPV-miR-5 and mir-5编码位置

预测的BmCPV编码的mir在线[http: //rna. tbi. univie. ac. at/cgi-bin/RNAfold. cgi 绘制二](http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi%E7%BB%98%E5%88%B6%E4%BA%8C)级结构和在线[http: //122.205.6.127/3dRNA/3dRNA. html 绘制](http://122.205.6.127/3dRNA/3dRNA.html%E7%BB%98%E5%88%B6)3-D结构，mir-3和mir-5二级结构见图3-3, 3-D结构见图3-4，为BmCPV的miRNA功能研究提供参考[118]。



**40**

**30**

**20**

**10**

**5'**

**BmCPV-mir-3**

**3'**

**60**

**70** **50**

**80**



**50**

**40**

**3'**

**70**

**60**

**5**

**30**

**20**

**'**

**10**

**BmCPV-mir-**

**5**

图3-3. Secondary structures of predicted viral miRNA precursors produced by Mfold program. The matured miRNA sequences are labeled by red curve.



图3-4. 3-D structures of predicted viral miRNA precursors produced by Mfold program.

基于[http: //www. mirbase. org/cgi-bin/blast. pl 搜索与](http://www.mirbase.org/cgi-bin/blast.pl%E6%90%9C%E7%B4%A2%E4%B8%8E)BmCPV编码的miR相似序列，未发现相同序列，与miR-3相似度最高的为stu-miR8002-3p（id: MI0025801）（图3-5），是马铃薯编码的1条成熟miR（Solanum tuberosum miR8002 stem-loop），序列对比显示，与BmCPV-miR-3相差了4个碱基（红色碱基）在第2、4、10、18碱基不同。



图3-5. BmCPV-miR-3与stu-miR8002-3p比较，差异碱基红色标记。

BmCPV-miR-5相同方法搜索未发现序列相似的mature-miR，推测miR-5保守性较高。

### 3.3.2 miR验证

#### 3.3.2.1 miR的Stem-loop RT-qPCR检测方法验证

感染BmCPV家蚕中肠，试剂盒提取总小RNA，10倍梯度稀释作为模板，绝对定量方法进行验证。结果显示，miR-3扩增效率为103.6%，而miR-5是104%（图3-6和图3-7），两条miRNA的Stem-loop RT-qPCR反应曲线、熔链曲线和扩增效率均能够满足本研究的要求。



**E=103.6%**

图3-6. BmCPV-miR-3扩增效率



**E=104%**

图3-7 BmCPV-miR-5扩增效率

#### 3.3.2.2 Stem-loop RT-qPCR验证miR及表达特征检测

感染BmCPV的家蚕，不同时间取样，提取总小RNA, Stem-loop RT-qPCR验证miR-3和miR-5及表达特征检测。结果显示，Stem-loop RT-qPCR能够检测到两条miR；表达量检测显示，BmCPV感染家蚕96 h, miR-5相对拷贝数约120，而miR-3拷贝数为700左右，推测miR-3表达量相对较多而miR-5较少；miR表达特征检测进一步发现，不同浓度BmCPV感染家蚕5h后均能够检测到miR-3和miR-5的存在，随着病毒感染时间的延长表达量有上升趋势，高浓度病毒感染在相同感染时间的miR拷贝数大多高于低浓度病毒感染的拷贝数（图3-8）.

800

700

600

500

miR 拷贝数

400

300

200

100

0

0h 5h 24h 48h 72h 96h

病毒感染家蚕时间

140

miR-3

高浓度病毒感

染

低浓度病毒感染

120

100

miR拷贝数

80

60

40

20

0

miR-5

0h 5h 24h 48h 72h 96h

病毒感染家蚕时间

图3-8 不同浓度BmCPV感染家蚕miR-3、miR-5表达特征

3.3.3.3 Northern blot验证

感染BmCPV的家蚕，不同时间取样，提取总小RNA，电泳检测总小RNA质量，DNA探针验证miR-3和miR-5，小RNA电泳结果显示提取的总小RNA质量能够满足检测要求（图3-9.）。Northern blot验证结果显示，不同感染时间的5个样品，miR-3探针和miR-5探针均有反应斑点，表明miR-3和miR-5能够用Northern blot检测到；miR表达特征检测进一步发现，对照Probe1和Probe2, BmCPV感染家蚕5h，可以检测到miR-3和miR-5，表达量均较少，随着感染时间的延长，表达量逐渐增多，miR-3斑点较miR-5大，推测miR-3的表达量较miR-5多（图3-10）。



图3-9 感染BmCPV家蚕中肠提取总小RNA电泳图谱

1. 感染BmCPV 5 h，2. 感染BmCPV 24 h，3. 感染BmCPV 48 h，4. 感染BmCPV 72 h，5. 感染BmCPV 96 h



图3-10 感染BmCPV家蚕中肠总小RNA Northern blot图谱

Probe1. BmCPV-miR-3, Probe2. BmCPV-miR-5, Sample1. 感染BmCPV 5 h, Sample2. 感染BmCPV 24 h, Sample 3. 感染BmCPV 48 h, Sample4. 感染BmCPV 72 h, Sample5. 感染BmCPV 96 h

Stem-loop RT-qPCR和Northern blot方法检测BmCPV编码的miR，结果显示，均能够检测到两条miR，表达特征也趋于一致，miR-3表达量相对较多而miR-5较少。本研究认为，BmCPV能够编码miR-3和miR-5, BmCPV感染家蚕5h即编码miRNA发挥功能，表达特征检测显示，家蚕感染病毒初期两条miRNA表达量均相对较少，随着感染病毒时间的延长，miRNA表达量有上升趋势。

### 3.3.4 miR靶基因的预测

基于在线[http: //bibiserv. techfak. uni-bielefeld. de/rnahybrid 的](http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid%E7%9A%84)RNAhybrid软件预测miR靶基因，预测步骤如图3-11，家蚕靶基因预测结果如表3-4所示，miR-5和miR-3的靶基因各有4个。BGIBMGA004054功能为ATP结合盒（ABC）转运蛋白基因家族[119]；BGIBMGA004827家蚕上尚未有报道，同源基因功能是通过MAPK3 / MAPK1通路转录调控在细胞膜上的一个身份不明的受体[120]；BGIBMGA009814在家蚕上尚未见报道，同源基因是类似于磷酸丝氨酸磷酸酶(PSP)基因，转换L-磷酸丝氨酸的代谢，参与细胞信号转导必须的基因[121]；BGIBMGA009202是冈比亚按蚊结构蛋白的一个同源基因，在家蚕上未见报道[122]；BGIBMGA011774为嘌呤核苷磷酸化酶，是影响核苷酸代谢的一种酶，Cheng等报道家蚕使用JHA可导致该基因表达上调[123]；BGIBMGA001913家蚕上尚未见报道，同源基因与蜜蜂的凝血酶敏感蛋白类似，推测

功能是对细胞增殖的抑制作用[124]；BGIBMGA011880是对硫磷水解酶相关蛋白，2011年Xiu Wang等进行了克隆分析[125]；BGIBMGA002651是N-乙酰神经氨酸磷酸合酶，与家蚕唾液酸形成有关[126]；病毒靶基因预测结果（表3-5）显示，miR-3只调控BmCPV-S3，病毒粒子结构蛋白基因；而miR-5似乎无符合条件的靶基因。

**3. MiR对病毒和宿主靶基因预测方法**



图3-11 预测miR靶基因步骤示意图

表3-4 RNAhybrid软件预测miR对家蚕靶基因

| Accession No. | MiRNAs hits | MiRNA binding  Site on mRNA | MFE  (Kcal/mol) | Known function |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| BGIBMGA004054 | BmCPV-miR-5 | 631-650 | -20.7 | Similar to ATP-binding  Cassette,sub-family F (GCN20), member 3 isoform 2 |
| BGIBMGA004827 | BmCPV-miR-5 | 127-146 | -22.2 | MSTP052 |
| BGIBMGA009814 | BmCPV-miR-5 | 392-411 | -21.7 | Similar to Phosphoserine  Phosphatase (predicted) |
| BGIBMGA009202 | BmCPV-miR-5 | 119-138 | -23.5 | Anopheles gambiae str. PEST |
| BGIBMGA011774 | BmCPV-miR-3 | 831-850 | -26.8 | Similar to purine nucleoside phosphorylase, partial |
| BGIBMGA001913 | BmCPV-miR-3 | 903-922 | -21.4 | Similar to thrombospondin repeat protein1 |
| BGIBMGA011880 | BmCPV-miR-3 | 298-317 | -21.1 | Similar to parathion hydrolase  (Phosphotriesterase)-related protein |
| BGIBMGA002651 | BmCPV-miR-3 | 300-319 | -22 | Similar to N-acetylneuraminic acid phosphate synthase isoform 1 |

表3-5 RNAhybrid软件预测miR对BmCPV靶基因

| Accession No. | MiRNAs hits | MiRNA binding site on mRNA | MFE  (Kcal/mol) | Known function | Prediction s |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| GQ924587.1 | BmCPV-miR-3 | 477-496 | -32.6 | RRSV P1, Parvo-like virus minor capsid protein, human papillomavirus capsid protein, bacteriophage WO |  |

## 3.5 讨论

当发现病毒编码的miRNA具有许多特定功能的时候[127]，引起了研究者们巨大的兴趣。近年来陆续发现多种病毒能够编码miRNAs, miRNAs在病毒感染、潜伏、与宿主作用中均体现了重要的功能，在病毒的侵染、复制和包装方面，miRNA途径具有重大的研究价值[128]。BmCPV是家蚕肠道型RNA病毒，其编码的miRNA对BmCPV的复制、致病过程及机理、以及分子防治具有重要研究意义，对无合适细胞株的肠道型RNA病毒的研究，例如人类的诺如病毒，可提供有价值的研究方法。

发现miRNA的方法有高通量测序[129]、克隆测序[130]和计算机预测[131]等，借助软件预测miRNA并进行验证[132]的报道近年来较多，但预测的可能性结果较多，假阳性率高，大量的验证无法避免[133]。BmCPV感染家蚕中肠提取总RNA后深度测序建立小

RNA文库，进行对比分析预测和验证miRNA，是常用的一种方法。

miRNAs的验证，Northern blot和Stem-loop RT-qPCR报道较多。还可以采用其他检测方法，poly(A) -tail RT-PCR[134]、Taqman PCR等均是目前常用的检测miRNA的方法。本研究采用地高辛标记Northern blot和Stem-loop RT-qPCR两种方法进行验证，均能够检测到两条miR，确认了BmCPV能够编码miRNA的事实。发现并验证BmCPV能够编码miRNAs是本研究的一大创新。

miRNA绝对定量检测是常用方法之一[135]，感染BmCPV的家蚕中肠，已经编码

miR，适合检测方法的验证，Stem-loop RT-qPCR结果显示，反应曲线、熔链曲线均符合检测要求[136]，扩增效率约为104%，处于合理区间[137]，检测体系适用于本研究，可信度高。

据文献报道，大多数的miRNA的发现病毒编码的基因间隔区，有些是由内含子编码区，3'或5'非翻译区。只有很少的在编码区域编码，例如，KSHV（卡波氏肉瘤相关疱疹病毒）mir-k12-10是K12基因编码[138]，巨细胞病毒报道的9条miRNA，其中3条位于已知基因的ORFs区编码，HSV-1 miR- LAT是由LAT基因的ORF编码等[139]，本研究的两条BmCPV编码的miRNAs对比分析表明是由编码区编码，而miRNA的加工机制是未知的。

miRNAs靶基因预测上，目前有多种方法和多种软件，miRanda[140]，

DIANA-microT[141], TargetScan[142], MicroInspector[143], PicTar, miTarget[144], RNA22[145]，

microTar[146]等，但大部分软件均适用于哺乳动物，线虫及果蝇等，RNAhybrid 是

Rehmsmeier等基于miRNA和靶基因二聚体二级结构开发的miRNA靶基因预测软件，在这方面也有研究报道[147]，对于本研究，以家蚕mRNA为靶标，RNAhybrid分析，“种子区”法筛选，参考了2010年Singh J等预测BmNPV编码的miRNAs的靶基因报道的方法。本研究预测靶基因的方法值得尝试。

感染家蚕的BmCPV，与Wu P 2011报道的是同一种材料，预测病毒miRNAs 的

map选用Cao报道的BmCPV-sz株基因组，同属中国种，同源性较高。预测宿主的靶基因，可以选用家蚕全部mRNA，但Wu P等2010年报道了采用基因芯片分析家蚕感染BmCPV 72 h之内的差异基因，作为预测的靶基因，可能更具针对性。本研究预测的宿主靶基因，有些功能还未见报道，病毒调控这些基因表达的机理目前还无法推测。

miRNA表达特征是病毒重要特性之一，往往与病毒逃避免疫反应和病毒潜伏等多种功能有关，SV40后期大量表达miRNA与逃避免疫有关，而疱疹病毒感染前期大量表达miRNA，病毒复制后期几乎无表达，与病毒潜伏有关[148]。miRNA时空表达特征是许多研究者感兴趣的内容，可以用来推测一些生物学现象。本研究结果对miRNA与家蚕基因组互作的关系，miRNA影响宿主的基因的表达，miRNA与BmCPV病毒各分节基因相互作用的细致研究[149]，miRNA的靶位点研究等提供重要的参考价值，逐步解开BmCPV编码的miRNA神秘的功能。

## 3.6 本章小结

根据测序信息，首次发现BmCPV能够编码miRNA，对其中的两条进行了生物信息学分析，分别由BmCPV基因组RNA第三片段(No. 478～497 bp)和第五片段

（No.2481~2500bp）编码产生，编码位置在基因片段ORF区，分别命名为miR-3和miR-5，并绘制了其二级结构和三级结构图谱；Northern blot和Stem-loop RT-qPCR两种方法能够检测到两条miRNAs的存在。

两条miRNAs表达特征显示，miR-5在BmCPV复制过程中拷贝数相对较少，miR-3拷贝数较多；结果还显示，BmCPV感染家蚕5h即可检测到miRNA的表达，表达特征显示，家蚕感染病毒初期两条miRNA表达量均相对较少，随着感染病毒时间的延长，miRNA表达量有上升趋势。为研究BmCPV的miRNAs提供重要的理论依据。

# **第四章** **BmCPV-miRNA**对病毒本身基因表达调控研究

## **4.1** 引言

家蚕质型多角体病毒是家蚕的重要病毒病原之一，家蚕因该病毒感染发病常给蚕业生产造成重大损失，对于该病缺乏有效的防治手段。

目前已经发现有多种RNA病毒能够编码miRNAs，在细胞水平上研究其生物学功能，HIV编码miRNA作用于TATA盒区域增强了其病毒复制；西尼罗河病毒编码的

miRNA样小RNA在3'非翻译区，具上调GATA4 mRNA和促进病毒在蚊子细胞中的复制的功能；*Ebola*编码的miRNA表现为促进病毒复制并认为miRNA可能成为治疗埃博拉药物新靶点[150]。已知的几种RNA病毒编码的miRNAs，通过不同的作用方式，大多表现为促进病毒复制。

BmCPV是一种双链RNA病毒，探索BmCPV编码的miRNAs功能，有助于探明

miRNAs对病毒复制的调控，进而为抗病毒药物靶点的选择和抗病毒新疗法提供技术支持。本研究以第三章预测的BmCPV编码的miRNAs为研究对象，人工合成单链miR和Inhibition-miR，采用体腔注射法探索对病毒本身基因表达的影响。

## **4.2** 材料与方法

### 4.2.1 试验材料

a. 家蚕质型多角体病毒；家蚕

b. BmCPV-miR-3、BmCPV-miR-5、Inhibition-miR（反义miR）-3、Inhibition-miR-5和mini-Control片段（对照区片段，与病毒和宿主均无关，简称mi-C）（上海吉玛生物制药有限公司合成）

### 4.2.2 试验方法

#### 4.2.2.1 家蚕饲养

家蚕饲养方法参考3.2.1 a的方法

#### 4.2.2.2 miRNA序列设计

参考第三章的研究结果，预测miR-3和miR-5成为研究序列，miRNAs功能试验方案参考Shi, S. -J.等的方法[151] ，人工合成单链miR 及

Inhibition-miRNA oligonucleotides（也称Anti-miRNAs, 简称AMOs），2’-O甲氧乙基修饰增强稳定性[152]，修饰过的寡核苷酸链作过量促进试验，反义链作为抑制剂[153]，mi-C为对照，由上海吉玛制药有限公司合成，序列见表4-1。

表4-1 人工合成的BmCPV-miR序列

| miR 名称 | Sequence(5' to 3') | 修饰 |
| --- | --- | --- |
| BmCPV-miR-1 | UAUCUUGAUCGUAAUUGAGU | 2'O 修饰 |
| Inhibition-miR-1 | ACUCAAUUACGAUCAAGAUA | 2'O 修饰 |
| BmCPV-miR-5 | UGAAUUUGCU CGUUAAGGGC | 2'O 修饰 |
| Inhibition- miR-5 | ACUUAAACGA GCAAUUCCCG | 2'O 修饰 |
| mi-C | UUGUACUACACAAAAGUACUG | 2'O 修饰 |

#### 4.2.2.2 病毒攻毒，单链miR家蚕体腔注射和中肠收集病毒添食参考3.1.2. a 的方法

家蚕体腔注射参考Hamamoto等的方法[154]，单链miR或Inhibition-miR 15 OD(1

OD约33.5×103 ng dsRNA）用75μL DEPC水溶解，与含3μL脂质体的75μL DEPC水混匀（2%脂质体溶液），制备成浓度约为3000 ng /μL的miR溶液，20 min后使用。每头蚕用10μL微量进样器注射约2μL溶液，相当于4000~6000 ng当量miR混合液，针头从家蚕环节处皮下注入，注射溶液后针头停留蚕体3 s后拔出，对照组注射不含

miR的溶液，每次取样三个重复。

家蚕中肠收集参考3.2.1 b的方法。

#### 4.2.2.3 病毒RNA的提取

病毒RNA提取方法参考3.2.1的方法

#### 4.2.2.4 miR功能研究实验设计

a. 过量miR对BmCPV基因表达影响研究设计：5龄起蚕75头/区，给家蚕添食BmCPV，混匀饲养5h后开始随机取蚕注射miR后，正常饲养，分别于24 h、48 h、72 h和96 h取样，每次随机取样5头蚕，每次取三个重复，同时设置mi. C区和空白区。

b. Inhibition-miR对BmCPV基因表达影响研究设计：5龄起蚕75头/区，感染

BmCPV后，混匀饲养5h后开始随机取蚕注射Inhibition-miR，正常饲养至24 h、48 h、

72 h和96 h取样，每次随机取样5头，每次取三个重复，同时设置mi. C区和空白区。上述样品解剖取家蚕中肠-80℃保存，提取总RNA后RT-qPCR检测。

#### 4.2.2.5 Primers

本研究检测所需的BmCPV分节基因引物和内参引物设计参考吴萍的方法，参考Bustin，S.等[155]在线（[http: //bioinfo. ut. ee/primer3-0.4.0/](http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/)）优化片段大小、退火温度、GC%含量等设置；PCR验证特异性，片段测序无误。RT-qPCR验证反应曲线、扩增效率，筛选得到适合的引物如表4-2所示。

表4-2. Sequences of primers for RT-qPCR

| name | Forward | Reverse | target |
| --- | --- | --- | --- |
| BmCPV-S1 | GCAAACGAAGCTCTTCATCC | CGATACGATCGTCTGCTTCA | GU323605.1 |
| BmCPV-S2 | CAAGGTCACAAGTATGATTACT | CTGACATTATTGCTGTACCTAC | GQ924586.1 |
| BmCPV-S3 | GGCGATTGGCCTAGAACATA | GACGCGCTTCTAGCTCAGTT | GQ924587.1 |
| BmCPV-S4 | CGAGTATCAACAATGACACG | GGATGTCCTCTATCTGTCTC | GU323606.1 |
| BmCPV-S5 | CTATTCGCATTCCCACTCA | GGTACTGCATATGCAAGTCG | GQ294468.1 |
| BmCPV-S6 | GTTATACGAAGAATATGGCC | CGTCTGCTCTTGGATACGAC | GQ294469.1 |
| BmCPV-S7 | GATCTATGCTCATTAGAAGG | CCTGCTGTGCGCATTGAGTT | GQ150538.1 |
| BmCPV-S8 | GAGATGGAATCAATCACAAG | GCGAACGCGAAACACTCTAC | GQ150539.1 |
| BmCPV-S9 | ACCAAAACGCACGCTAAAGT | GTTGAAATGATGCGACATGG | GQ924588.1 |
| BmCPV-S10 | GATCAGCACACAACGTAATG | GGTATCCAAGTTACACGAGC | GQ924589.1 |
| Internal control | CGGCTACTCGTTCACTACC | CCGTCGGGAAGTTCGTAAG | Bm-β-actin |

#### 4.2.2.6 RT-qPCR

RT-qPCR的方法参考一般方法。结果采用2-△△Ct方法[156]计算靶基因的表达差异，进而判断miR对病毒基因表达的影响效果。

## 4.3 试验结果与分析

### 4.3.1 miR-3和Inhibition-miR-3对BmCPV基因表达的影响

感染BmCPV家蚕五龄幼虫体腔注射miR-3和Inhibition-miR-3，不同时间取样后提取总RNA, RT-qPCR检测病毒各基因的表达。结果如图4-1所示，注射miR-3和Inhibition-miR-3能够影响BmCPV各基因表达，相对于mi. C处理区，miR-3和Inhibition-miR-3均能够上调BmCPV基因表达，未发现有表达下调基因；miR-3能够上调S1、S3、S4、S5、S6、S7、S8、S9和S10基因的表达；而Inhibition-miR-3能够上调S9和S10基因的表达，对其它基因上调作用不明显；比较miR-3和Inhibition-miR-3，对BmCPV S1、S3、S4、S5、S6、S7、S8片段，miR-3促进作用比较显著，而对S2、S9和S10三个分节基因，两者影响效果差异不显著。注射miR 对

BmCPV基因表达影响有效作用时间，注射后24 h表现影响效果，至72 h后影响效果被掩盖，注射后48 h miR达到最佳作用时间。

10

G e n e e x p r e s s io n

8

6

4

2

0

24H 48h 72h Time post infection

10

8

G e n e e x p r e s s io n

6

4

2

0

24H 48h 72h Time post infection

8 70

60

G e n e e x p r e s s io n

G e n e e x p r e s s io n

6 50

40

4 30

20

2 10

0 0

24H 48h 72h Time post infection

24h 48h

Time post infection

**BmCPV-S1** **BmCPV-S2** **BmCPV-S3** **BmCPV-S4**

12

G e n e e x p r e s s io n

10

8

6

4

2

0

24H 48h 72h Time post infection

8

6

G e n e e x p r e s s io n

4

2

0

24H 48h 72h Time post infetion

25

20

G e n e e x p r e s s io n

15

10

5

0

24H 48h 72h Time post infection

5

4

G e n e e x p r e s s io n

3

2

1

0

24H 48h 72h Time post infection

**BmCPV-S5** BmCPV-S6 BmCPV-S7 **BmCPV-S8**

12

10

G e n e e x p r e s s io n

8

6

4

2

0

24H 48h 72h Time post infection

6

5

G e n e e x p r e s s i o n

4

3

2

1

0

24H 48h 72h Time post infection

**miR-3**

**Inhibit-miR-3**

**BmCPV-S9** **BmCPV-10**

**mi. C**

图4-1. miR-3和Inhibition-miR-3对BmCPV基因表达的影响

### 4.3.2 miR-5和Inhibit-miR-5对BmCPV基因表达的影响

感染BmCPV家蚕注射miR后，不同时间取样，病毒专用试剂盒提取总RNA, RT-qPCR检测，结果如图4-2.显示，相对于mi. C处理区，miR-5和Inhibition-miR-5均能够上调BmCPV基因表达，未发现有下调基因；miR-5能够显著上调S1、S2、S3、

S5、S6、S8、S9和S10基因的表达，Inhibition-miR-5能够上调S7和S10基因的表达，对其它基因表达影响有限；比较miR-5和Inhibition-miR-5，对BmCPV S1、S2、S3、S5、S6和S9基因，miR-5促进作用比较显著，S4、S8和S10，两者差异不明显，对于S7, Inhibition-miR-5促进作用高于miR-5。注射miR-5对BmCPV基因表达影响有效作用时间，注射后48 h表现影响效果，至72 h影响效果达到最高，96 h后被掩盖。

100

G e n e e x p re s s io n

80

60

40

20

0

24H 48h 72h 96h Time post infection

25

20

G ene ex p r e ssio n

15

10

5

0

24H 48h 72h 96h Time post infection

10

8

G ene ex p re s s io n

6

4

2

0

24H 48h 72h 96h Time post infection

50

40

G e ne ex p r e ssion

30

20

10

0

24H 48h 72h 96h Time post infection

**BmCPV-S1** **BmCPV-S2** **BmCPV-S3** **BmCPV-S4**

25

G e n e e x p r e s s io n

20

15

10

5

0

24H 48h 72h 96h Time post infection

100

80

G e n e e x p r e s s io n

60

40

20

0

24H 48h 72h 96h Time post infection

40

30

G e n e e x p r e s s io n

20

10

0

24H 48h 72h 96h Time post infection

8

6

G e n e e x p r e s s io n

4

2

0

24H 48h 72h 96h Time post infection

**BmCPV-S5** **BmCPV-S6** **BmCPV-S7** **BmCPV-S8**

14 5

12 4

G e n e e x p r e ssio n

Ge n e e x p r e ssio n

10

8 3

6 2

4

2

0

24H 48h 72h 96h Time post infection

1

0

24h 48h 72h 96h Time post infection

**MiR-5 Inhibit-miR-5**

**BmCPV-S9** **BmCPV-S10**

**mi.C**

图4-2. 注射miR-5和Inhibition-miR-5对BmCPV基因表达的影响

比较miR-3和miR-5，两条miR及Inhibition-miR影响BmCPV基因表达有差异，有效作用时间也不一致。

## 4.4 讨论

对于病毒miRNAs的功能研究，大部分基于细胞水平上进行[157]，建立稳定表达

miRNAs细胞系或构建双荧光表达载体等常用方法，在生物体内环境研究miRNAs功能的报道不多见。本研究采用家蚕体腔注射的方法，2%脂质体混合寡核苷酸链溶液，结果显示，感染病毒家蚕注射单链miRNAs, RT-qPCR检测，与对照区比较，病毒基因的表达发生了变化，推测是miRNAs的作用结果。家蚕感染BmCPV剂量可控，基因表达特征能够检测，暗示着家蚕感染BmCPV模型可能用于miRNAs功能研究。

绝大多数病毒编码的miRNA功能还没有完全阐释清楚，病毒miRNAs通过两种方式来参与病毒的持续性感染的建立和维持，1. 病毒编码的miRNAs靶向病毒自身与复制相关的多种基因的表达，促进病毒在细胞中的复制和逃逸细胞的免疫杀伤作用；2. 病毒基因表达的自动调控，这种自动调控模式既能将病毒特异性的抗原限制在较低水平，还能阻止病毒进入裂解性感染周期，促使病毒在感染细胞中维持潜伏性感染。本研究实验结果显示，感染病毒家蚕注射miRNAs，病毒部分基因表达上调，推测BmCPV感染家蚕组织后，除病毒RDRP酶对病毒复制起主要作用外[158]，还可以通过miRNAs途径来促进病毒部分或全部基因表达来促进病毒与细胞的寄生关系。

在抑制miRNAs方法上，采用反义寡聚核苷酸（Inhibition-miRNAs或AMOs）[159]，

在一些研究中被成功应用[160]，也有使用miRNA s拮抗分子的研究[161]。由于BmCPV的miRNAs是新的发现，拮抗分子方面没有研究基础，选用2’-O修饰的Inhibition-miRNA [162]，也是可以尝试的一种方法。miRNAs容易降解，2’-O修饰可大大增加其稳定性，据目前报道，2’-O修饰的AMOs在人体细胞miRNAs功能研究中稳定性可达7天左右，对于本研究，是值得一试的技术方法。本研究结果显示，体腔注射家蚕后，miRNAs有效时间可以达到48 h左右，能够满足研究的要求。

BmCPV同属的RNA病毒，编码的miRNAs，通过不同的作用方式，大都表现为促进病毒的复制。本研究预测的BmCPV编码的miR-3和miR-5，体腔注射感染病毒家蚕的结果表明，过量miR能够促进病毒大部分基因表达上调，与报道的RNA病毒编码的miRNAs具有相似的功能；但Inhibition-miRNAs处理区未能下调病毒部分基因的表达，无法完美解释miR的功能。目前报道的RNA病毒编码的miRNAs功能的研究中，WNV的kun-mir-1在蚊细胞中能够促进病毒RNA复制，而抑制剂能够使病毒

RNA复制明显减少；*Ebola*病毒和HIV病毒具有类似的研究结果；DNA病毒属编码的miRNAs也有不少类似的研究报道，均为促进和抑制效应同时存在。目前RNA病毒属报道编码miRNAs的大多为单链RNA病毒，而dsRNA病毒编码miRNAs的报道似乎不多见，BmCPV编码的miRNAs功能研究是首次探索。dsRNA病毒有两条子链，一条可以作为mRNA，另一条为编码mRNA的“母链”，抑制寡核苷酸链AMOs是与

miR完全互补片段，能否适用于双链RNA病毒编码的miRNAs功能研究，目前还没有可以参考的技术方案，因此，探索BmCPV编码的miRNAs的功能还需要进一步的细致研究。

miRNAs功能较复杂，BmCPV编码的miRNAs还有很多后续研究可以开展，可能还有未发现的miRNAs, miRNAs与家蚕基因组的互作关系，对宿主的基因的表达是否有影响，miRNAs与BmCPV病毒各分节基因相互作用的细致研究，miRNA的靶位点等，能够逐步解开病毒miRNA的神秘功能。

## 4.5 本章小结

本章主要探索了BmCPV编码的miRNAs的功能，从实验结果分析，初步认为，

BmCPV编码的miR-3体腔注射感染病毒的家蚕，能够显著上调BmCPV的S1、S3、

S4、S5、S6、S7、S8、S9和S10基因的表达；而BmCPV-miR-5能够显著上调BmCPV的S1、S2、S3、S5、S6、S8、S9和S10基因的表达；实验暗示着家蚕体腔注射法可作为研究BmCPV的miRNA功能的方法；miR在家蚕体腔血液中的有效时间，miR-3注射后24 h~72 h，48 h影响效果最佳，而miR-5注射后48 h~96 h，72 h影响效果较好。

# **第五章** **dsRNA**干扰**BmCPV-RDRP**基因表达研究

## **5.1** 引言

家蚕质型多角体病毒病，在养蚕生产上具有较大的危害性，该病是一种慢性病，病原是一种具包涵体的多角体病毒，病毒通过家蚕食下感染，侵染中肠圆筒状细胞，在细胞质中形成多角体，导致细胞破裂，病毒多角体通过粪便排出体外，感染其它健康个体，形成严重的蚕座传染。家蚕幼虫感染病毒后，正常消化功能受到影响，相继发病死亡，蚕茧减产甚至绝收，对蚕桑生产造成巨大的威胁。目前对BmCPV感染还没有特效型的治疗药剂，生产上主要通过加强养蚕前消毒，蚕期蚕座消毒，养蚕结束后的回ft消毒等预防措施进行预防。对于发病个体，只能淘汰处理，无其它有效手段。

BmCPV的基因组由10段克分子数相等的dsRNA组成，总相对分子量为20.3×106 Da。研究认为BmCPV基因组编码的结构蛋白(structure protein)存在于病毒粒子中，主要构成病毒粒子完整的形状；而编码的非结构蛋白(non-structure protein)不出现在病毒粒子中，仅在病毒的复制、装配等过程中发挥作用。BmCPV基因组全序列已被测定并公布，各片段主要功能都被推测报道。

RNAi是机体中古老而天然的抗病毒机制[163]。利用RNAi抗病毒研究已经非常深入[164]，人类病毒病中的乙型肝炎病毒[165]、HIV病毒和疱疹病毒[166]，动物病毒中的Canine parvovirus[167]、Newcastle disease virus [168]等，研究结果显示siRNA对病毒的增殖有明显的抑制作用。家蚕siRNA抗病毒研究集中在核型多角体病毒，在细胞水平上筛选干扰其复制必须基因ie-1有效的dsRNA，通过转基因技术获得了抗NPV的蚕品种[169]。

鳞翅目昆虫RNAi研究有许多成功应用的报道[170]，在卵、幼虫、蛹基因功能研究上有很大进展，微量注射，喂育和体腔注射是常用的技术手段，对幼虫的研究，发现非侵入性的体腔注射方法比喂育更有优势[[171]，预示着体腔注射dsRNA能够应用于更多的研究。本研究尝试家蚕体腔注射人工合成dsRNA的方法来验证dsRNA干扰病毒复制的效果，分子靶标选用BmCPV-RDRP基因（RNA-dependent RNA polymerase, RDRP）。

RDRP是BmCPV第二分节片段基因，该基因全长3854bp（Genbank序列号为GQ：

924586.1），在病毒增殖过程中起核心作用的活性酶[172]。

本研究以家蚕质型多角体病毒依赖于RNA的RNA聚合酶(BmCPV-RDRP)基因为靶标，设计合成三条dsRNA序列，研究dsRNA家蚕幼虫体内干涉病毒增殖的效果。

希望通过研究为在家蚕幼虫研究dsRNA干扰病毒增殖和病毒与宿主相互作用提供了一个有效的方法。

## **5.2** 材料和方法

### 5.2.1 试验材料

一般材料见第二章

### 5.2.2 试验方法

#### 5.2.2.1 家蚕饲养

家蚕饲养参考3.1.2 a的方法。

#### 5.2.2.2 dsRNA片段设计与合成：

基于NCBI（[http: //www. ncbi. nlm. gov. cn](http://www.ncbi.nlm.gov.cn/)）上BmCPV-RDRP基因核苷酸序列，

[http: //bioinfo. clontech. com/rnaidesigner/sirnaSequenceDesignInit. do](http://bioinfo.clontech.com/rnaidesigner/sirnaSequenceDesignInit.do)设计dsRNA，选用基因前、中、后各一个干扰区（图5-1）[175]，由Shanghai Gemma Biological Pharmaceutical Co., Ltd.合成dsRNA（表5-1），2’F 修饰[176]。

表5-1. Sequences of dsRNA

| Name | target | Passenger strand（5’-3'） | Guide strand（5’-3'） |
| --- | --- | --- | --- |
| dsRNA1 | RDRP-981 | GCGAGCGGAACUAUUAUAUTT | AUAUAAUAGUUCCGCUCGCTT |
| dsRNA2 | RDRP-1857 | GCGUCAGUCACAGGUUAAATT | UUUAACCUGUGACUGACGCTT |
| dsRNA3 | RDRP-2592 | GCCAAGAGGAGGAGAAUAUTT | AUAUUCUCCUCCUCUUGGCTT |
| R-control | control | UUCUCCGAACGUGUCACGUTT | ACGUGACACGUUCGGAGAATT |

RT-qPCR primer locations



981bp 1857bp 2592bp

BmCPV-RD

RP gene

1 3854bp

dsRNA1 dsRNA2 dsRNA3

图5-1. Schematic representation of BmCPV-RDRP gene, showing dsRNA target sites and primer pairs. Red arrows indicate dsRNA target sites and PCR primers are represented by blue arrows.

江苏科技大学农学博士学位论文

#### 5.2.2.3 病毒感染，dsRNA注射和中肠收集病毒感染参考3.1.2. a 的方法

dsRNA溶液配制参考Brass等的方法[173]，将dsRNA 15 OD（1 OD约33.5×103 ng dsRNA）用75μL DEPC水溶解，与含3μL脂质体的75μL DEPC水混匀（2%脂质体溶液），制备成浓度约为3000 ng /μL的dsRNA溶液，20 min后使用。dsRNA注射参考Hamamoto的方法[174]，每头蚕用10μL微量进样器注射约2μL溶液，相当于4000~6000 ng当量dsRNA混合液，针头从家蚕环节处皮下注入，注射溶液后针头停留蚕体3s后拔出，对照组注射不含dsRNA的溶液。

家蚕中肠收集参考3.1.2. b的方法。

#### 5.2.2.4 病毒RNA提取

病毒RNA提取参考3.1.3的方法。

#### 5.2.2.5 干涉效果检测

a. 家蚕感染BmCPV后RDRP基因表达特征：

5龄起蚕90头/区，分别为病毒区和不攻毒区，病毒区每头家蚕添食BmCPV 约

80万粒多角体，分别于感染后5 h、12 h、24 h、48 h、72 h和96 h取样，每次随机取样5头蚕作一个样品，重复取3个样品，解剖取家蚕中肠-80℃保存，提取总RNA后RT-qPCR检测。

b. 体腔注射家蚕体腔内扩散的模拟实验

家蚕体腔注射参考Hamamoto的方法，1%灭菌考马斯亮蓝溶液与2%脂质体混匀后，2μL/头的剂量注射5龄起蚕，观察染料溶液进入家蚕体腔后的扩散效果，推测dsRNA溶液注射入家蚕体腔后的扩散分布。

c. dsRNA对BmCPV-RDRP基因干扰效果的检测：

家蚕注射dsRNA后感染病毒（预防试验）试验设计：参考Kilcher S等[177]和Novina，

C. D等[178]研究dsRNA对病毒干扰的设计方案，家蚕注射dsRNA溶液后感染病毒，5龄起蚕75头/区，注射dsRNA后，给家蚕添食BmCPV，分别于5 h、24 h、48 h、72 h取样，每次随机取样5头蚕作一个样品，重复取3个样品。

家蚕注射dsRNA前感染病毒（治疗试验）试验设计：参考McCaffrey, A. P等[179]研究dsRNA干扰病毒的方法，家蚕先感染病毒，再注射dsRNA。5龄起蚕75头/区，感染BmCPV后，混匀饲养5h后开始随机取蚕注射dsRNA，正常饲养至24 h、48 h、72 h、96 h取样，每次随机取样5头，重复取3个样品。

上述样品解剖取家蚕中肠-80℃保存，提取总RNA后RT-qPCR检测。

#### 5.2.2.6 BmCPV-RDRP基因受干扰后对病毒其它片段基因表达的影响

研究BmCPV-RDRP基因受干扰后对病毒其它基因片段表达的影响，选用家蚕注射dsRNA前感染病毒的试验区制备的样品，提取总RNA后，选用BmCPV基因组第一、第五片段引物，RT-q PCR检测两个片段基因表达变化情况，推测对病毒复制的影响。

#### 5.2.2.7 Primers

本研究检测所需的BmCPV分节基因引物和内参引物设计参考吴萍的方法，参考Bustin，S.等在线（[http: //bioinfo. ut. ee/primer3-0.4.0/](http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/)）优化片段大小、退火温度、GC%含量等设置；PCR验证特异性，片段测序(Shanghai Biological Engineering Co., Ltd.)无误。RT-qPCR验证反应曲线、扩增效率，筛选得到适合的引物如表5-2所示。

表5-2. Sequences of primers for RT-qPCR

Name Forward(5'-3') Reverse(5'-3') **Target** BmCPV-1 GCAAACGAAGCTCTTCATCC CGATACGATCGTCTGCTTCA GU323605.1 BmCPV-2 CAAGGTCACAAGTATGATTACT CTGACATTATTGCTGTACCTAC GQ924586.1 BmCPV-5 CTATTCGCATTCCCACTCA GGTACTGCATATGCAAGTCG GQ294468.1

Internal control

CGGCTACTCGTTCACTACC CCGTCGGGAAGTTCGTAAG Bm-β-actin

#### 5.2.2.8 RT-qPCR

方法参考第二章一般材料与方法，采用2-△△Ct方法计算靶基因的表达差异，进而判断dsRNA对靶基因表达的抑制效果。

## 5.3 试验结果与分析

### 5.3.1 BmCPV-RDRP基因表达特征

感染BmCPV家蚕，不同时间取样，提取总RNA, RT-PCR检测BmCPV-RDRP基因表达，结果显示，家蚕感染BmCPV 5 h后，在其中肠总RNA中RT-qPCR可以检测到RDRP基因的存在（图5-2），24 h后RDRP基因表达进入高速增长期。从表达特征来看，病毒添食家蚕后，96 h之内，BmCPV-RDRP基因在家蚕中肠组织表达处于快速增长状态。



图5-2 不同浓度BmCPV感染家蚕后RDRP基因表达特征

### 5.3.2 BmCPV基因检测引物的验证

对本研究所需BmCPV分节基因（1, 2, 5）设计的引物，以BmCPV感染家蚕72

h作为检测样品，提取总RNA, PCR扩增目的片段，10倍梯度稀释后RT-qPCR求扩增效率。克隆片段Shanghai Biological Engineering Co., Ltd.测序，均为BmCPV序列；RT-qPCR 预实验显示，检测引物的扩增曲线、扩增效率在合理范围内（图5-3），表明所设计的引物符合RT-q PCR的要求。

BmCPV M I



E=109%

E=110%



200bp

-S1



BmCPV



200bp

-S2



BmCPV



E=109%



200bp

-S5



图。5-3. 检测引物的RT-qPCR反应曲线，扩增效率，检测片段和熔链曲线示意图

### 5.3.3 注射液在家蚕体腔内扩散的模拟实验

对5龄起蚕体腔注射2%脂质体和1%考马斯亮蓝混合液，观察注射液在家蚕体腔内的扩散情况。结果显示，20 s内，家蚕各腹足显示出均匀的蓝色（图5-4.），推测考马斯亮蓝染料与家蚕血液混匀后迅速扩散。配置好的dsRNA溶液是一种水溶液，给家蚕体腔注射后，应能够在短时间内与家蚕血液混匀后而发挥作用。

CK



家蚕体腔注射

图。5-4. 家蚕体腔注射染料后的扩散情况

### 5.3.4 dsRNA对BmCPV-RDRP的干扰效果

家蚕体腔注射染料

对感染病毒的家蚕5龄幼虫体腔注射dsRNA，不同时间取样，提取总RNA后RT-qPCR检测dsRNA对BmCPV-RDRP基因表达的干扰效果。结果表明，根据BmCPV-RDRP基因核苷酸序列设计的三条dsRNA体腔注射蚕体，均能够引起BmCPV-RDRP基因表达发生变化，对比BmCPV-RDRP基因的表达特征和R-control处理区和空白组的特征（图5-5），证实BmCPV-RDRP基因表达变化是注射的dsRNA引起，家蚕体腔注射dsRNA可用于BmCPV-RDRP基因干扰研究。

三条dsRNA干扰效果，在注射后感染BmCPV（图5-5. b），相对于R-control区，

dsRNA1在家蚕感染BmCPV后5 h显示有干扰效果，干扰效率达到97%左右，在72 h左右的干扰效率只有76%（表5-4）；而dsRNA2在感染BmCPV 48h～72 h最佳干扰效率为93%（表5-5）；dsRNA3在家蚕刚感染BmCPV 5 h之内的效果最佳，最好干扰效率为95%，至72h左右的干扰效率为72%。注射前感染BmCPV, RT-qPCR数据显示

（图5-4. c），注射dsRNA1后24 h，干扰效率只有74%，到48 h，干扰效率到97.8%, 72 h后干扰效率为0；而dsRNA2, 24 h干扰效率55%，48h～72 h干扰效率可达99%以上，96 h后干扰效率降低；dsRNA3，24 h干扰效率52%, 48 h可达97%, 72 h降低到56%, 96 h干扰效果消失（表5-5.）。

研究还发现，相同dsRNA在治疗组和预防组试验中干扰效果表现有差异，预防组中dsRNA3前期效果较好，后期dsRNA2效果较好；治疗组中dsRNA2干扰效果最明

显。

比较三条dsRNA干扰效果，研究结果证明dsRNA2干扰效果相对较好，特别在注射前感染病毒处理组，在24h~48h能够较好地抑制BmCPV-RDRP基因的表达，是值得研究的干扰片段。



a b c

图5-5. dsRNA干扰BmCPV-RDRP基因的表达

：R-control；：dsRNA1处理区；：dsRNA2处理区；：dsRNA3处理区

a. 相对于不感染病毒的家蚕R-control区BmCPV-RDRP表达特征

b. 注射后感染病毒BmCPV-RDRP基因表达

c. 注射前感染病毒BmCPV-RDRP基因表达

表。5-4. 注射后感染病毒试验区RT-qPCR -2-△△Ct值（以R-control处理区为参照品）

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Time | 5h | 12h | 24h | 48h | 72h |
| dsRNA1 | 0.027 | 0.964 | 1.26 | 1.44 | 0.24 |
| dsRNA2 | 0.67 | 0.6 | 1.23 | 0.186 | 0.073 |
| dsRNA3 | 0.056 | 0.047 | 1.21 | 1.26 | 0.286 |

表。5-5. 注射前感染病毒试验区RT-qPCR- 2-△△Ct值（以R-control处理区为参照品）

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Time | 24h | 48h | 72h | 96h |
| dsRNA1 | 0.26 | 0.022 | 1.18 | 2.123 |
| dsRNA2 | 0.45 | 5.55E-05 | 0.0002577 | 0.378 |
| dsRNA3 | 0.48 | 0.031 | 0.444 | 1.464 |

### 5.3.5 BmCPV-RDRP基因抑制后对病毒基因组其它片段表达的影响

对感染病毒的家蚕体腔注射dsRNA，不同时间取样，提取总RNA后RT-qPCR检测BmCPV基因组第1和5两个片段的表达变化。结果显示，三条dsRNA处理区，

RDRP基因表达受抑制，片段1表达量明显与RDRP表达趋势相一致（图.5-5. a. b. c），表达量RDRP基因为对照区的26%(表.5-4)而片段1为对照区的13%(表.5-6)；48 h, RDRP基因为对照区的2.2%，片段1为7.3%；72 h, RDRP表达量为118%，片段1为178%，推测RDRP基因表达对片段1表达影响较大。dsRNA2和dsRNA3干扰效应与dsRNA1干扰效应基本一致，均表现为RDRP基因表达下调时，片段1表达下调，

RDRP基因表达上调后，片段1表达大幅上调（图.5-5. b, c）. dsRNA对片段5表达的影响，结果显示，与片段1结果基本一致，表现为RDRP

基因表达下调，片段5表达低于对照区，RDRP基因表达上调，片段5表达也上调（表

5-6）(图.5-6. a. b. c)。

从研究结果可以推测，RDRP基因表达对片段1和片段5表达产生较大影响，佐证了RDRP基因在病毒复制中的重要作用。



a b c

图。5-6. BmCPV-RDRP基因被干扰后第一片段表达变化。

dsRNA1处理区；b. dsRNA2处理区；c. dsRNA3处理区;. R-control; BmCPV-S3;

a b c



图。5-7. BmCPV-RDRP基因被干扰后第五片段表达变化。

a. dsRNA1处理区；b. dsRNA2处理区；c. dsRNA3处理区;. R-control; BmCPV-S3;

表.5-6. BmCPV片段1基因和片段5基因的RT-qPCR- 2-△△Ct值（以R-control处理区为参照品）

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Time |  | 24h | 48h | 72h | 96h |
| dsRNA1 | Segment 1 gene | 0.13 | 0.073 | 1.78 | 39.6 |
| Segment 5 gene | 0.14 | 0.23 | 5.36 | 1.93 |
| RDRP gene | 0.26 | 0.022 | 1.18 | 2.123 |
| dsRNA2 | Segment 1 gene | 0.52 | 0.0017 | 0.006 | 0.723 |
| Segment 5 gene | 0.41 | 0.001 | 0.007 | 0.232 |
| RDRP gene | 0.45 | 5.55E-05 | 0.0002577 | 0.378 |
| dsRNA3 | Segment 1 gene | 1.19 | 0.32 | 0.54 | 2.38 |
| Segment 5 gene | 0.33 | 0.06 | 4.35 | 0.41 |
| RDRP gene | 0.48 | 0.031 | 0.444 | 1.464 |

## 5.4 讨论

与HCV防治研究类似，可以研究BmCPV其他化学药物的防治方法，但同样面临着药物筛选，对家蚕的安全性等许多问题，时间漫长。从目前研究现状看，RNAi无疑是直接和有效的方法，可以培育转基因抗BmCPV品种家蚕[180]。

无细胞模型病毒的基础研究，一直是学术界的难题，如人类和动物的Norovirus病毒，是一种肠道型RNA病毒，研究进展上与BmCPV有许多共同之处[181]。在尚未找到替代细胞之前，Novina，C. D等[182]认为，RNAi可以通过生物体或动物模型达到相同的研究效果。家蚕作为模型生物由来已久[183]，BmCPV具有包涵体，是容易纯化和控制浓度的一种病毒，家蚕定量感染BmCPV是一种可控的感染方式，各分节基因表达可用RT-qPCR的方法检测，因此，可以尝试探索建立该病的动物感染和增殖模型来进行dsRNA干扰研究[184]。

本研究参照Hamamoto的家蚕皮下注射方法，发现皮下注射的溶液能够很快扩散至全身，分布均匀，佐证家蚕皮下注射dsRNA液能够很快扩散而分布于家蚕全身，不会形成局部淤积或出血损失，这种方法适合本研究的要求。

RDRP基因是BmCPV基因组第二分节片段，本研究采用dsRNA干扰BmCPV-RDRP基因，与大多数病毒的RDRP基因功能一样，BmCPV-RDRP基因在RNA病毒转录、复制过程中起到非常重要的作用[185]，它一方面以病毒RNA为模版复制子代病毒的基因，另一方面将病毒增殖过程中需要的蛋白质和酶类基因转录为mRNA，即具有复制酶和转录酶的双重功能。人类一些dsRNA病毒病的分子治疗研究，例如SARS病毒[186]，肝炎病毒等RNA病毒，分子靶标均为RDRP基因。动植物转基因抗病毒病的研究中，分子靶标大都为病毒的RDRP基因。选用BmCPV-RDRP基因作为分子靶标进行RNAi研究，对于研究BmCPV的分子治疗具有重大意义。在干扰区域的选择上，虽然有的研究认为3'Untranslated region是抑制病毒最佳区域之一[187]，对于

BmCPV来说，RDRP基因3'Untranslated region尚未见报道。本研究认为，只要能够降低病毒表达，功能区域和3’-UTR区域均可以选择。

病毒RNA或DNA的RT-qPCR检测含量来判断疾病进展的预测因子[188]已经被多次应用，BmCPV感染家蚕后蚕体内的病毒是随着感染时间的延长含量是逐步增多的，RT-qPCR检测显示RDRP基因表达水平是逐步增高的，我们推测RDRP基因的RT-qPCR检测或许可以作为判断家蚕感染BmCPV病进展的因子之一。

检测方法上，RT-qPCR检测区域在BmCPV分节片段ORF区，且不与干涉区重叠，同时验证了检测特异性和扩增效率，均在合理的范围之内[189]；样品制备上，设置健康蚕作为对照进行特异性检测验证，取样时增加家蚕条数来减少误差等，使本研究重复性较好。

研究方法设计上，参考细胞水平研究dsRNA干涉病毒的研究，一般采用表达

dsRNA稳定转染系抗病毒感染和感染病毒后用dsRNA干涉来判断干涉效果。本研究

设置先注射dsRNA再感染病毒和感染病毒后再注射dsRNA两种处理方案，这种研究方法是可以接受的。

家蚕注射dsRNA剂量，Gandhe, A. S.每头Antheraea mylitta幼虫注射20 ng/mg当量dsRNA[190]干扰基因表达；而Mrinal, N.认为，家蚕幼虫注射dsRNA在100～1000 ng/mg是一个很高的剂量[191]。本研究根据Shanghai Gemma Biological Pharmaceutical Co., Ltd.提供的产品说明书建议0.5mL细胞培养液加入dsRNA 800 ng的剂量，浓度约

1.6 ng/mg即可达到较好的干扰效果，一头5龄起蚕体重约1 g, 0.25 mL血液[192]，本研究考虑蚕机体的复杂性，每头5龄起蚕注射4000～6000 ng的dsRNA，即4～6 ng/mg，从研究结果看，该剂量能够满足研究的要求。

dsRNA容易降解，本研究所用的dsRNA均2’-F修饰，可大大增加dsRNA稳定性，对于家蚕体腔注射来说，是可以尝试的一种技术方法，本研究显示，体腔注射家蚕后，dsRNA有效时间可以达到72 h左右，能够满足试验的要求。

通过家蚕生物体研究dsRNA干扰BmCPV-RDRP基因，采用家蚕幼虫体腔注射dsRNA溶液后，能够影响病毒基因的表达，预防试验和治疗试验dsRNA均能够对目标基因表达产生干扰效果，最大作用效果在注射后48 h～72 h，96 h后干扰效果被掩盖；研究结果显示，dsRNA2在预防组和治疗组均表现出较好的干扰效果，特别在治疗组，干扰效率达到99%时间能够维持24 h, dsRNA3在预防前期效果较好，在BmCPV感染家蚕后干扰效率及持续时间不如dsRNA2。从结果中还发现，片段1和片段5基因表达趋势与RDRP基因表达趋势基本一致，这两个片段均是编码病毒粒子的结构蛋白，也是病毒粒子组成部分，我们乐观地推测，病毒在家蚕体内的拷贝数可能降低了，dsRNA对病毒的增殖有干扰作用。

通过本研究，对于无细胞模型病毒的RNAi提供了可供参考的一种研究方法，家蚕生物体感染BmCPV研究模型可以用于BmCPV的RNAi干扰研究，也适用于研究BmCPV基因功能研究；对于研究结果，在转基因抗性品种研究、BmCPV基因片段的功能研究上，均极具巨大的参考价值。

## 5.5 本章小结

本章针对BmCPV-RDRP基因设计了三对dsRNA，通过注射家蚕的方式研究干扰效果，从试验结果看，设计的三条dsRNA能够干扰BmCPV-RDRP基因的表达；dsRNA干扰BmCPV基因表达的研究，可以采用家蚕皮下注射dsRNA片段方法；家蚕体腔注射4～6 ng/mg的dsRNA干扰剂量即可达到较好的研究效果；

筛选出干扰BmCPV-RDRP基因效果较好的dsRNA片段，干扰效率能够达到99.9%，为研究分子治疗和转基因抗性品种提供技术依据。

# 第六章 基于***piggyBac***转座子表达**dsRNA**转基因载体构建及检测

## **6.1** 引言

转基因载体是一类装载有外源DNA并使其随自身复制而得到扩增的DNA构造，并且具有可以将所携带外源基因在一定条件下插入到宿主基因组中的功能，以实现外源DNA的水平传递，整合进宿主基因组特定位置并得到表达。目前技术已经成熟并且应用到较多的生物转基因研究中。

目前已知的昆虫转座子主要有：P-转座子、minos转座子、hobo转座子、mosl转座子和*piggyBac*转座子等，这些转座子都有转座的功能获得了转基因昆虫[193]，在家蚕转基因研究中应用的只有minos转座子[194]和*piggyBac*转座子，其中*piggyBac*转座子的家蚕转基因研究中比较普通，已有较多的成功报道，应用也趋于成熟[195]。

启动子表达shRNA（small hairpin RNA, shRNA），研究广泛且在许多领域得到应用，主要用于RNA干扰（RNAi）和miRNAs功能的研究[196]，很多shRNA表达载体都采用依赖RNA聚合酶III启动子(pol III)[197], RNA polⅢ启动子操纵具有发夹结构特征的RNA，在各种离体细胞中的表达，RNA在细胞内会被细胞代谢酶加工成为

shRNA[198]等，从而引发基因功能发生改变。这一类启动子包括大家熟悉的人源和鼠源的U6启动子[199]、人H1启动子[200]和A3启动子[201]等。采用RNA pol III启动子的原因是作用机理清晰，被许多研究者采用的、表达效果好的优点，而且还能在多种细胞中表达其它的小分子RNA。转录出的RNA形成发卡样结构后，会在3’端形成2个突出的U（尿嘧啶），这类似于天然的siRNA，因而有利于双链RNA诱发RNAi，也有表达pre-miRNA[202]和3’UTR[203]. RNAi技术是发展非常迅速的技术，例如利用斑马鱼胚胎转录系统中特定的启动子来产生小分子干扰RNA[204]。

目前，组织特异型启动子的研究较多，如BmCP283启动子[205, 206]、家蚕中肠特异启动子BmAPN[207]、水稻球蛋白启动子[208]、大豆油酸去饱和酶基因启动子[209]、小麦淀粉粒结合淀粉合成酶启动子[210]、玉米球蛋白启动子[211]等，其中组织特异型启动子表达shRNA研究工作越来越趋向细腻，由起始研究的能表达到强表达到广谱表达再到特异性表达的研究过程，特别是一些short hair pin的RNA（shRNA）的过表达可诱导的急性毒性。这引起了人们对利用RNA干扰（RNAi）技术作为一种潜在的治疗工具的安全问题。因此，对于一些特异性组织和器官的疾病，采用特异性表达更符合需要[212]；RNAi技术的应用前景主要是基因功能研究、抗病毒治疗、抗肿瘤治疗[213]。

家蚕P2启动子是通过组织芯片筛选到的家蚕中肠特异性启动子（BGIBMGA 014298），是保幼激素结合蛋白家族成员之一[214]，根据目前的研究，能够实现在家蚕中肠组织特异性表达eGFP[215]，为肠道型病毒病的分子防治和基础研究提供了条件。目前在昆虫研究领域，表达shRNA的启动子大都是一些强启动子[216]，属于全身性的表达模式。组织器官特异性表达启动子目前在家蚕丝腺组织研究较多[217]，而在中肠组织，特异性表达相关shRNA尚未见报道。

本研究旨在将干扰BmCPV效果较好的dsRNA片段为表达目的基因，构建能够表达dsRNA的转基因载体，转入家蚕基因组，培育抗BmCPV品种。选用中肠特异性启动子P2的目的是为了在中肠组织高效表达而在其它部位低表达甚至不表达。首先构建了中间表达载体Bm-P2-dsRNA，经细胞瞬时转染和表达检测表明P2启动子能够表达dsRNA。基于*piggyBac*转座子构建表达dsRNA转基因载体，经转基因细胞试验和检测，得到转基因细胞，经检测，能够表达dsRNA，本研究为培育转基因抗BmCPV家蚕提供技术支撑。

## 6.2 材料和方法

### 6.2.1 试验材料

表达质粒PBM33（带有eGFP荧光基因，购自上海吉玛生物制药有限公司）家蚕细胞 苏州大学医学部贡成良实验室友情提供*piggyBac*转座子含*neo*基因和*helper*质粒苏州大学贡成良教授提供

试剂：siRNA检测试剂盒（上海吉玛生物制药有限公司合成）

### 6.2.2 试验方法

#### 6.2.2.1 Bm-P2启动子的克隆和分析

参考刘岩等的方法[218]，解剖P50 5龄家蚕丝腺，组织粉碎机研成匀浆，苯酚-氯仿法抽提家蚕基因组，引物设计参考2013年Jiang, L.的序列，如表6-1所示，常规PCR方法进行，克隆片段送上海生物工程公司测序，对序列结果进行分析。

表6-1 家蚕中肠组织特异性启动子P2序列引物

| 引物名称 | 引物序列 |
| --- | --- |
| Passenger strand(5'to3') | GAGTACTCGAAGCACAGGTTGCTGCG |
| Guide strand(5'to3') | GGCGCGCCTGCTGAAAGAAACGTACAATAAT GA |

#### 6.2.2.2 中间表达载体PBM-P2-dsRNA-eGFP构建及鉴定

a. 构建中间表达载体，测试P2启动子能否表达dsRNA. dsRNA序列参考第五章的研究，选取干扰效果较好的dsRNA2片段，为目标shRNA，设计表达shRNA的相应DNA序列，设计如下：

TCGAATTCCTGCAGGCGTCAGTCACAGGTTAAATTCAAGAGATTTAACCTGTGAC

TGACGCTTTTTTGGATCCACGGTACCGCG（下划线（ ）为表达shRNA序列，两端为*EcoI*（下划线为（ ））和*kpnI*酶切位点（下划线为（ ）），以6个连续“T”为终止信号，便于RNA内切酶识别和切割），全人工合成P2-dsRNA序列，带有*EcoI*和*kpnI*酶切位点，双酶切方式克隆至表达质粒PBM33，制备重组质粒经测序鉴定无误得到PBM-P2-dsRNA-eGFP中间表达载体。

b. 昆虫细胞常规培养参照Summers & Smith（1987）的方法进行[219]，细胞转染参照潘敏慧等的方法进行[220]。将BmN细胞以5×106 mL-1接种于六孔板中，设置三个重复，细胞贴壁后，弃掉培养液，以无血清TC-100洗2次，再加1 mL的无血清TC-100培养基，逐滴加入转染混合液（100μL转染体系中，含4μL Quick shuttle转染试剂、2μg瞬时表达载体PBM-P2-dsRNA-PolyA），4 h后以含10% FBS的TC-100培养基3 mL替换旧培养液。27℃培养3 h后，42℃诱导1 h，48 h后荧光显微镜（NIKKON TE-2000）观察（以未经过诱导的细胞作为对照）。

c. 收集有荧光细胞处理区，小RNA提取试剂盒抽提总小RNA，空白对照采用细胞液加表达质粒混匀。反转录引物和RT-检测引物设计参考Mike, H（2014）方法[221]，序列见表6-2.

表6-2. shRNA反转录引物和RT-检测引物

| 引物名称 | 序列（5’-3’） |
| --- | --- |
| URP-1 | TGGTGTCGTGGAGTCG |
| RT-primer | CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAATTTA |
| Forword-primer | ACACTCCAGCTGGGGCGTCAGTCACAGGT |

d. 检测方法的验证反转录产物梯度稀释，RT-PCR后计算扩增效率。

e. 表达检测，反转录产物RT-PCR绝对定量法检测，人工合成的siRNA制作标准曲线。

6.2.2.3基于*piggyBac*转座子构建表达dsRNA转基因载体

构建表达dsRNA的转基因载体，参考徐汉福等的方法[222]，*kpnI*，*EcoI*双酶切PBM-P2-dsRNA中间表达载体，1%琼脂糖电泳，切胶回收P2-dsRNA片段；同时双酶切*piggyBac*转座子空载体，1%琼脂糖电泳，切胶回收线性化转座子片段。P2-dsRNA片段：线性化*piggyBac*转座子=4.5: 0.5，T4快连酶试剂盒连接，转化，摇菌，涂板，挑菌，少量制备质粒后双酶切鉴定。得到pig-P2-dsRNA-GFP-*neo*转基因载体。

6.2.2.4瞬时细胞转染试验鉴定

瞬时细胞转染试验参考周文林等[223]的方法，pig-P2-dsRNA-GFP-*neo*转基因载体和*helper*质粒1: 1混合，Quickshuttle转染试剂转染家蚕细胞，6孔板转染，48 h后荧光显微镜下观察，收集有荧光细胞区，小RNA提取试剂盒提取总小RNA，空白对照采用细胞液加转基因载体和*helper*质粒混匀，stem-loop法检测。

## 6.3 试验结果与分析

### 6.3.1 Bm-P2启动子的克隆和在线分析

从P50 5龄家蚕丝腺中提取DNA，常规PCR克隆家蚕P2启动子，7μL PCR产物经过1%琼脂糖电泳30 min，凝胶成像仪下观察，结果如图6-1所示，片段大小650 bp左右，与设计的片段大小接近，克隆片段经上海生工测序，MatInspector软件分析，结果如图6-2所示，与2013年Jiang L等报道的P2启动子序列一致，推测本研究所用家蚕品种P50具有序列一致的P2启动子序列。

Marker



图6-1. Bm-P2启动子片段的克隆



图6-2 Bm-P2序列及启动子分析（Jiang L等，2013）

### 6.3.2 中间载体Bm-P2-dsRNA构建及表达效果检测

6.3.2.1表达载体构建鉴定

构建以P2为启动子表达dsRNA的中间载体，全人工合成的P2-dsRNA序列带有

*EcoI*和*kpnI*酶酶切位点，与PBM33连接，克隆后，小抽质粒*EcoI*和*kpnI*酶双酶切鉴定。结果如图6-3所示，测序结果见图6-4，表明PBM-P2-dsRNA-eGFP与设计一致。

构建好的表达载体测序后通过PlasMapper Version 2.0在线

（[http: //wishart. biology. ualberta. ca/PlasMapper/](http://wishart.biology.ualberta.ca/PlasMapper/)）绘制质粒图谱，结果如图6-5所示，中间表达载体包含家蚕细胞瞬时表达所需的各种元件。



图6-3 PBM33-P2-dsRNA双酶切示意图

PBM-P2-dsRNA-eGFP表达载体序列：

GAAGCACAGGTTGCTGCGGTCCCCGATAGCTGTTGTCCTATCCAATTCCATTTTTTTT TCAAGTAAGCCAAATTTGGAGTATGACAACGTATTAAGACTAAATAATTTCAGGCAT CTTGAAGTAATGCCATACATGTATTAAAGAACAGTTCAAAAACATTTCATGAATCTTG ACATAATAAATATATCTTTAATGTCTTAAATGAACTCATCACGAAAATGAACGAAAAC TCTGCAATAAGGATGATAATATTTACTTCTTTGTTTCAGTAATATTTTCCAAATTTATCA CCAATCTATCGATTTCGTGATTATCACGTCTCAATTTAATTTTGTTTTCACTTTGAAAT GTAATAATATACACATTTCAATCAGATAATCTTGATCAAGATTGTTTTAATGTACGTCA GCTAATAGAGAATACGTTATCAGCTTAAGCGTAGGAAACAGTATAAATACCGAATGA AAATTCAATAAATCGTACACATTTATTTGGTGAGGTAAGAGCATTTGTGTTTCTCAGG GAAACACTGAAAATTACATAAATTTTAACTTCTGTTCTCTCTATCAAAACAATTTCAA ATCATACCAGTTTAAATCGCAGGTGCCAAGTAACATTTATACTTCATTATTGTACGTTT CTTTCAGCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGGCGTC AGTCACAGGTTAAATTCAAGAGATTTAACCTGTGACTGACGCTTTTTTGGATCCACT AGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGCTTTTGTTCCCTTTAGTGAG GGTTAATTGCGCGTTAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACTAGAATGCA GTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTA TAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTCA GGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTATGG CTGATTATGATCAGTTATCTAGATCCGGTGGATCTGAGTCCGGACTTGTACAGCTCGT CCATGCCGAGAGTGATCCCGGCGGCGGTCACGAACTCCAGCAGGACCATGTGATCG CGCTTCTCGTTGGGGTCTTTGCTCAGGGCGGACTGGGTGCTCAGGTAGTGGTTGTC GGGCAGCAGCACGGGGCCGTCGCCGATGGGGGTGTTCTGCTGGTAGTGGTCGGCG AGCTGCACGCTGCCGTCCTCGATGTTGTGGCGGATCTTGAAGTTCACCTTGATGCCG TTCTTCTGCTTGTCGGCCATGATATAGACGTTGTGGCTGTTGTAGTTGTACTCCAGCT TGTGCCCCAGGATGTTGCCGTCCTCCTTGAAGTCGATGCCCTTCAGCTCGATGCGGT TCACCAGGGTGTCGCCCTCGAACTTCACCTCGGCGCGGGTCTTGTAGTTGCCGTCG TCCTTGAAAAGATGGTGCGCTCCTGGACTAGCCTTCGGGCTGGCGGACTTGAAGAA GTCTTGCTGCTTCATGTGGTCGG

图6-4 中间表达载体PBM-P2-dsRNA-eGFP序列

1."“：P2启动子；2. ” “表达dsRNA的DNA序列；3. ” “eGFP序列



图6-5 PBM-P2-dsRNA-eGFP表达载体示意图

6.3.2.2中间表达载体细胞瞬时转染与检测

a. 中间表达载体细胞瞬时转染

测试中间表达载体PBM-P2-dsRNA表达效果，将构建好的表达质粒通过家蚕细胞瞬时表达，48 h后荧光显微镜观察。结果如图6-6所示，家蚕细胞出现绿色荧光，对照区无反应，表明Bm-P2启动子能够驱动eGFP基因表达，产生特异性的绿色荧光蛋白。





发光细胞

空白对照瞬时转染家蚕细胞

图6-6 瞬时表达载体在Bm细胞中的表达（400×）

b. 表达shRNA检测

检测shRNA，收集瞬时表达细胞，专用小RNA提取试剂盒提取细胞液小RNA, RT-primer反转录，RT-PCR检测，以未处理的细胞混合表达质粒为对照。

检测siRNA方法的验证，以人工合成的siRNA为模板，梯度稀释后RT-qPCR，结果如图6-7所示，扩增效率为104%，能够应用于本研究。



图 6-7 RT-PCR检测shRNA曲线和溶解曲线

细胞液提取的总小RNA为模板，RT-qPCR，结果如图6-8所示，瞬时转染家蚕细胞区shRNA表达量是空白区的40倍，推测Bm-P2启动子能够驱动dsRNA序列表达。

CK

表达质粒

50

40

30

shRNA 表达

20

10

0

-10

图6-8. shRNA表达效果检测

### 6.3.3 转基因表达载体构建及细胞转染检测

a. 表达dsRNA转基因载体构建

构建表达dsRNA转基因表达载体，以P2-dsRNA为目的片段，*piggyBac*转座子为载体，构建pig-P2-dsRNA-ploy(A) -GFP-neo表达dsRNA转基因载体，*KpnI*和*EcoI*双酶切*piggyBac*转座子，电泳切胶回收线性化的空载体，与P2-dsRNA连接、转化、摇菌，双酶切鉴定，结果如图6-9所示，在750 bp处有条带，与P2-dsRNA片段大小一致，测序结果表明序列确是P2-dsRNA，表明目的片段与转座子连接成功。



图6-9 双酶切pig-P2-dsRNA-ploy(A) -GFP-neo载体

b. 家蚕细胞转染试验

家蚕细胞转染试验测试表达siRNA效果，构建好的转基因载体，转染家蚕细胞，正常培育30 d后，荧光显微镜下观察，结果如图6-10所示，荧光显微镜下有团状发光细胞，而对照区无任何荧光，但荧光现象较弱，推测可能是P2启动子表达较弱。





发光细胞群

空白细胞转基因载体转染细胞图6-10. 转基因载体细胞转染试验（400×）

收集细胞液，小RNA提取试剂盒提取细胞液的总RNA，反转录后real-time PCR绝对定量检测，结果如图6-11所示，转基因载体转染细胞区shRNA表达量是空白区的60倍左右，推测转基因载体表达了shRNA。

CK

转基因表达载体

80

70

60

50

shR NA 表达

40

30

20

10

0

-10

-20

图6-11. siRNA检测效果

## 6.4 讨论

虽然表达shRNA可选的启动子较多[224]，表达活性高且研究成熟，但也有缺点，不同的研究选用合适的启动子表达具有不同的意义，这越来越被许多研究者所认识。本研究意在寻找中肠特异性表达shRNA启动子，以便在特定组织器官中表达所需要的

shRNA作为研究材料，而全身性强表达启动子可能会带来不必要的和无法预见的生物学效应，本研究选用家蚕中肠特异性启动子，基于以家蚕中肠为靶器官，在中肠特异性表达dsRNA而在其它组织、器官低表达甚至不表达，降低外源dsRNA可能带来的负面效应。

选用合适的启动子编码目的基因一直是生物工程领域的研究热点，本研究选用常用的方法对组织特异性启动子Bm-P2表达shRNA可行性进行研究。从载体选择到构建，是研究启动子表达的常用方法[225]，本研究将上海吉玛生物公司提供的U6表达载体中的U6启动子切除，替换Bm-P2启动子，测序结果显示无误，从方法上预示研究是可以持续的。

细胞瞬时转染是研究启动子能否表达常用的方法之一，也适合本研究。在细胞瞬时转染效率上，细胞状态、质粒浓度、转染试剂和细胞密度均是影响因素，本研究的细胞转染效率相对较低，发光细胞数量较少，对启动子的表达强度可能产生影响，检测结果显示细胞液中shRNA浓度较低。

在检测shRNA方面，northern blot是验证小RNA可信度较高的方法[226]，由于价格高昂，RT-qPCR绝对定量检测也是常用的方法[227]。

常用的启动子U6、A3和ie能够高效表达shRNA[228]，本研究未进行比较试验，只能初步推测Bm-P2能够表达shRNA。

生物体转基因之前，转基因细胞试验是必须环节，测试能否转入，转入位置，表达目的基因效果等，本研究只测试了转基因载体表达dsRNA可行性。

## 6.5 本章小结

通过本章研究，构建的中间表达载体PBM-P2-dsRNA，家蚕细胞瞬时转染及stem-loop检测，初步认为，家蚕中肠启动子P2具有启动表达siRNA的功能，但表达效果尚需进一步的研究；基于*piggyBac*转座子构建的pig-P2-dsRNA-poly（A）转基因载体，家蚕细胞转染试验及RT-qPCR检测表明，能够表达siRNA，但其转基因能力需进一步论证。

结 **论**

本研究对感染家蚕BmCPV中肠小RNA文库进行测序，预测获得BmCPV编码的

miRNAs并进行了生物信息学分析，对其中的两条进行鉴定和表达特征检测；采用体腔注射的方法探索miRNAs对病毒本身基因表达的影响；并且还探索了siRNA干扰BmCPV-RDRP基因，根据研究结果构建了转基因表达载体，对于防治该病具有重大意义。获得研究结果如下：

1. BmCPV编码的miRNAs预测、生物信息学分析、鉴定和表达特征检测

对感染BmCPV家蚕中肠组织后提取总小RNA，通过深度测序预测了BmCPV编码的miRNAs. 对其中的两条miRNAs进行分析，分别为BmCPV-S3编码的miR-3和BmCPV-S5的miR-5；绘制了其二级结构和3-D结构；Stem–loop RT-qPCR和Northern

blot两种方法验证，确认了两条miRNAs的存在；表达特征检测进一步表明，miR-3表达量相对较多而miR-5表达较少，家蚕感染BmCPV 5h后能检测到病毒编码的miRNA，24 h后表达量呈上升趋势。

2. 初步研究了BmCPV编码的miRNAs对病毒基因表达的调控

感染BmCPV家蚕体腔注射过量miR和Inhibition-miR的方法，研究miRNAs对病毒基因表达的影响，发现注射miRNAs能够对病毒基因表达产生影响，过量miR能够显著促进病毒部分基因表达。

3. 研究了dsRNA干扰BmCPV-RDRP基因的表达。

以家蚕质型多角体病毒依赖于RNA的RNA聚合酶(BmCPV-RDRP)基因为靶标，设计合成三条dsRNA序列，体腔注射家蚕幼虫，检测靶基因表达。每头5龄蚕注射4～6 ng/mg剂量的dsRNA，能够干扰BmCPV-RDRP基因的表达；注射dsRNA后感染病毒的处理区干扰效率可达93%，而注射dsRNA前感染病毒的干扰效率可达99.9%；同时，检测BmCPV的二个结构蛋白基因片段（S1、S5），其表达水平随着RDRP基因

表达水平降低而降低，推测dsRNA干扰BmCPV-RDRP基因表达能够影响病毒的增殖。

4. 构建了基于*piggyBac*表达dsRNA的转基因载体

克隆了家蚕中肠特异性启动子P2，构建中间表达载体PBM-P2-dsRNA-eGFP，家蚕细胞瞬时转染和RT-qPCR检测表明启动子P2能够表达dsRNA；基于*piggybac*转座子构建pig-P2-dsRNA-ploy(A) -eGFP-*neo*表达dsRNA转基因载体，家蚕细胞转染和RT-qPCR检测表明表达dsRNA转基因载体能够表达dsRNA。

参 考 文 献

[1] van Regenmortel M H, Fauquet C M, Bishop D H, et al. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [M]. Academic Press, 2000 pp234-248

[2] Aruga H. *Cytoplasmic polyhedrosis* of the silkworm--historical, economical and epizootiological aspects [J]. Aruga, Hisao The *Cytoplasmic Polyhedrosis* Virus of thesilkworm, 1971, (120-130)

[3] Adams J R, Bonami J R. Atlas of invertebrate viruses [J]. Atlas of invertebrate viruses, 1991, (423-430)

[4] Fauquet C M, Mayo M A, Maniloff J, et al. Virus taxonomy: VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [M]. Academic Press, 2005 pp145-156

[5] 孙士英. 生物农药——昆虫病毒[J]. 现代农村科技, 1990, (9):

[133] 金伟, 动物, 浙江大学. 家蚕病理学[M]. 中国农业出版社, 2001 pp56-65

[7] 黄自然，卢蕴良. 家蠶病毒概述[J]. 广东蚕业, 1964, 4(010).

[8] Wyckoff R W. Structure within Polyhedra Associated with Insect Virus Diseases1 by Kenneth M. Smith Plant Virus Research Unit, Agricultural Research Council, Molteno Institute, Cambridge [J]. Selected papers on virology, 1964, 223.

[9]余学奎，卢英，张红, et al. 家蚕质多角体病毒(BmCPV)结构研究[J]. Acta Biochimica Et Biophysica Sinica, 1999, 5): 563-566.

[10]邹凤莲，钟伯雄. 家蚕质型多角体病毒基因组的研究现状[J]. 中国蚕业, 2000, 84(4)：43-44.

[11] Cao G, Meng X, Xue R, et al. Characterization of the complete genome segments from BmCPV-SZ, a novel *Bombyx mori cypovirus* 1 isolate [J]. Canadian journal of microbiology, 2012, 58(7): 872-883.

[12] Hagiwara K, Tomita M, Kobayashi J, et al. Nucleotide sequence of *Bombyx mori cytoplasmic polyhedrosis* virus segment 8 [J]. Biochemical and biophysical research communications, 1998, 247(3): 549-553.

[13] Hagiwara K, Tomita M, Nakai K, et al. Determination of the nucleotide sequence of *Bombyx mori cytoplasmic polyhedrosis* virus segment 9 and its expression in BmN4 cells [J]. Journal of Virology, 1998, 72(7): 5762-5768.

[14] Hagiwara K, Matsumoto T. Nucleotide sequences of genome segments 6 and 7 of *Bombyx mori cypovirus* 1, encoding the viral structural proteins V4 and V5, respectively [J]. Journal of General Virology, 2000, 81(4): 1143-1147.

[15] Hagiwara K, Kobayashi J, Tomita M, et al. Nucleotide sequence of genome segment 5 from *Bombyx mori cypovirus* 1 [J]. Archives of virology, 2001, 146(1): 181-187.

[16] Hagiwara K, Rao S, Scott S W, et al. Nucleotide sequences of segments 1, 3 and 4 of the genome of *Bombyx mori cypovirus* 1 encoding putative capsid proteins VP1, VP3 and VP4, respectively [J]. Journal of General Virology, 2002, 83(6): 1477-1482.

[17] Kuchino Y, Nishimura S, Smith R E, et al. Homologous terminal sequences in the double-stranded RNA genome segments of cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm *Bombyx mori* [J]. Journal of Virology, 1982, 44(2): 538-543.

[18] Nakazawa H, Kendirgi F, Belloncik S, et al. Effect of mutations on the intracellular localization of Bombyx mori cytoplasmic polyhedrosis virus polyhedrin [J]. Journal of General Virology, 1996, 77(1): 147-153.

[19] Payne C C, Mertens P P. Cytoplasmic polyhedrosis viruses [M]. Springer, 1983. The reoviridae

[20] McCrae M, Mertens P. In vitro translation studies on and RNA coding assignments for *cytoplasmic polyhedrosis* viruses [J]. Double-stranded RNA Viruses, 1983, 35-41.

[21] Ikeda K, Nagaoka S, Winkler S, et al. Molecular characterization of *Bombyx mori cytoplasmic polyhedrosis* virus genome segment 4 [J]. Journal of Virology, 2001, 75(2): 988-995.

[22]钟伯雄. 家蚕质型多角体病毒的三磷酸核苷酸结合蛋白！[J]. 蚕业科学, 2001, 27(1)：38-42.

[23]孙京臣，谭佩婵，陈冬妮, et al. BmCPV病毒增殖的组织病理研究[J]. 广东蚕业, 2004, 38(4): 23-28.

[24]孙京臣， 陈冬妮， 杨艺峰，et al. 质型多角体病毒在家蚕体内入侵与复制研究[J]. 中ft大学学报

（自然科学版, 2006, 45(2):

[25] Cheng L, Sun J, Zhang K, et al. Atomic model of a cypovirus built from cryo-EM structure provides insight into the mechanism of mRNA capping [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011, 108(4): 1373-1378.

[26]刘仕贤，张远能，霍用梅. 家蚕不同品种抗CPV性能的差异[J]. 蚕业科学, 1979, 4（010）。

[27]张志芳. 家蚕对质型多角体病毒病抵抗性的遗传和育种方法研究——Ⅰ.家蚕对质型多角体病毒病抵抗性的遗传规律初探[J]. 蚕业科学, 1986，（4）：

[28]张志芳，黄龙全. 家蚕抗CPV病性和抗DNV病性间的遗传相关分析[J]. 广东蚕业, 1989, 3（018）。

[29]廖琼香，朱德贞，陈翰英, et al. 抗性蚕品种“研137×7532·湘晖”的育成报告[J]. 广东蚕业, 1990, 4(011).

[30]段家龙，胡祥珑. 家蚕质型多角体病抗病性的选择方法及效果[J]. 蚕业科学, 1991, 80-83.

[31]陈萍， 朱勇， 鲁成，et al. 家蚕对质型多角体病毒（CPV）的抵抗性及其与经济性状相关性分析[J].

西南农业大学学报, 1999, 190-193.

[32]徐安英，李木旺. 家蚕品种资源对质型多角体病毒抵抗性的初步比较试验[J]. 蚕业科学, 2002, 28(157-159).

[33]吴萍. 家蚕感染质型多角体病毒差异表达基因研究[D]；中国农业科学院, 2010。

[34] Wu P, Li M, Wang X, et al. Differentially expressed genes in the midgut of silkworm infected with cytoplasmic polyhedrosis virus [J]. African Journal of Biotechnology 2009 Vol 8 No 16 pp 3711-3720, 2009, 8(16): 3711-3720.

[35]吴萍，刘挺，覃光星，et al. 家蚕中肠组织感染质型多角体病毒的应答基因分析[J]. 中国农业科学, 2011, 44(13)：2814-2822.

[36] Gao K, Deng X Y, Qian H Y, et al. Novel protein of IBP from silkworm, *Bombyx mori*, involved in cytoplasmic polyhedrosis virus infection [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2012, 110(1): 83–91.

[37]梁振中. 家蚕防病消毒药物研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(10): 2-2.

[38]薛仁宇. 表达dsRNA的转基因家蚕对BmNPV的抗性研究[D];苏州大学, 2009.

[39] Xie P, Liu Y, Li Y, et al. MIROR: a method for cell-type specific microRNA occupancy rate prediction [J]. Molecular Biosystems, 2014, 10(6): 1377-1384.

[40] Pillai R S. Inhibition of Translational Initiation by Let-7 MicroRNA in Human Cells [J]. Science, 2005, 309(5740): págs. 1573-1576.

[41] Thermann R, Hentze M W. Drosophila miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation [J]. Nature, 2007, 447(7146): 875-878.

[42] Mathonnet G, Fabian M R, Svitkin Y V, et al. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F [J]. Science, 2007, 317(5845): 1764-1767.

[43] Wakiyama M, Yokoyama S. MicroRNA-Mediated mRNA Deadenylation and Repression of Protein Synthesis in a Mammalian Cell-Free System [J]. Progress in Molecular & Subcellular Biology, 2010, 50(85-97).

[44] Nottrott S, Simard M J, Richter J D. Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes [J]. Nature structural & molecular biology, 2006, 13(12): 1108-1114.

[45] Petersen C P, Bordeleau M-E, Pelletier J, et al. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells [J]. Molecular cell, 2006, 21(4): 533-542.

[46] Wu L, Belasco J G. Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs [J]. Molecular cell, 2008, 29(1): 1-7.

[47] Giraldez A J, Mishima Y, Rihel J, et al. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs [J]. Science, 2006, 312(5770): 75-79.

[48] Mazroui R, Di Marco S, Kaufman R J, et al. Inhibition of the ubiquitin-proteasome system induces stress granule formation [J]. Molecular biology of the cell, 2007, 18(7): 2603-2618.

[49] Vasudevan S, Tong Y, Steitz J A. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation [J]. Science, 2007, 318(5858): 1931-1934.

[50]Ørom U A, Nielsen F C, Lund A H. MicroRNA-10a binds the 5′UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation [J]. Molecular cell, 2008, 30(4): 460-471.

[51] Alvarez-Garcia I, Miska E A. MicroRNA functions in animal development and human disease [J]. Development, 2005, 132(21): 4653-4662.

[52] Sempere L F, Freemantle S, Pitha-Rowe I, et al. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation [J]. Genome biology, 2004, 5(3): R13.

[53] Calin G A, Sevignani C, Dumitru C D, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(9): 2999-3004.

[54] Kaufman E J, Miska E A. The microRNAs of Caenorhabditis elegans; proceedings of the Seminars in cell & developmental biology, F, 2010 [C]. Elsevier.

[55] Krichevsky A M, King K S, Donahue C P, et al. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development [J]. Rna, 2003, 9(10): 1274-1281.

[56] Kloosterman W P, Wienholds E, de Bruijn E, et al. In situ detection of miRNAs in animal embryos using LNA-modified oligonucleotide probes [J]. Nature methods, 2006, 3(1): 27-29.

[57] Neely L A, Patel S, Garver J, et al. A single-molecule method for the quantitation of microRNA gene expression [J]. Nature methods, 2006, 3(1): 41-46.

[58] Fazi F, Rosa A, Fatica A, et al. A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPαregulates human granulopoiesis [J]. Cell, 2005, 123(5): 819-831.

[59] Ambros V, Lee R C. Identification of microRNAs and other tiny noncoding RNAs by cDNA cloning [M].

Springer, 2004. RNA Interference, Editing, and Modification

[60] Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, et al. Identification of microRNAs of the herpesvirus family [J]. Nature methods, 2005, 2(4): 269-276.

[61] Schmittgen T D, Jiang J, Liu Q, et al. A high‐throughput method to monitor the expression of microRNA precursors [J]. Nucleic acids research, 2004, 32(4): e43-e43.

[62] Jiang J, Lee E J, Gusev Y, et al. Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines [J]. Nucleic acids research, 2005, 33(17): 5394-5403.

[63] Fabani M M, Gait M J. miR-122 targeting with LNA/2′-O-methyl oligonucleotide mixmers, peptide nucleic acids (PNA), and PNA–peptide conjugates [J]. Rna, 2008, 14(2): 336-346.

[64] Hutvágner G, Simard M J, Mello C C, et al. Sequence-specific inhibition of small RNA function [J]. PLoS Biology, 2004, 2(4): e98.

[65] Zeng Y, Cai X, Cullen B R. Use of RNA polymerase II to transcribe artificial microRNAs [J]. Methods in enzymology, 2005, 392(371-380).

[66] Cimmino A, Calin G A, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2 [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(39): 13944-13949.

[67] Scaria V, Hariharan M, Maiti S, et al. Host-virus interaction: a new role for microRNAs [J]. Retrovirology, 2006, 3(1): 68.

[68] Seo G J, Chen C J, Sullivan C S. Merkel cell polyomavirus encodes a microRNA with the ability to autoregulate viral gene expression [J]. Virology, 2009, 383(2): 183–187.

[69] Houzet L. MicroRNAs and human retroviruses [J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 2011, 1809(11-12): 686-693.

[70] Sullivan C S, Grundhoff A T, Tevethia S, et al. SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells [J]. Nature, 2005, 435(7042): 682-686.

[71] Pan X, Zhang B, Francisco M S, et al. Characterizing viral microRNAs and its application on identifying new microRNAs in viruses [J]. Journal of cellular physiology, 2007, 211(1): 10-18.

[72] Zhang Y, Fan M, Geng G, et al. A novel HIV-1-encoded microRNA enhances its viral replication by targeting the TATA box region [J]. Retrovirology, 2014, 11(3): 382-392.

[73] Kaul D, Ahlawat A, Gupta S D. HIV-1 genome-encoded hiv1-mir-H1 impairs cellular responses to infection [J]. Molecular & Cellular Biochemistry, 2009, 323(1-2): 143-148.

[74] Kincaid R P. RNA virus microRNA that mimics a B-cell oncomiR [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(8): 3077-3082.

[75] Rosewick N, Momont M, Durkin K, et al. Deep sequencing reveals abundant noncanonical retroviral microRNAs in B-cell leukemia/lymphoma [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013, 110(6): 2306-2311.

[76] Hussain M. West Nile virus encodes a microRNA-like small RNA in the 3′untranslated region which

Up-regulates GATA4 mRNA and facilitates virus replication in mosquito cells [J]. Nucleic acids research, 2012, 40(5): 2210-2223.

[77] Hussain M, Asgari S. MicroRNA-like viral small RNA from Dengue virus 2 autoregulates its replication in mosquito cells [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014, early edition(7): 2746-2751.

[78] Liang H, Zhou Z, Zhang S, et al. Identification of *Ebola* virus microRNAs and their putative pathological function [J]. Science China Life Sciences, 2014, 57(10): 973-981.

[79] Weinberg M S, Morris K V. Are viral-encoded microRNAs mediating latent HIV-1 infection [J]. DNAandcellbiology, 2006, 25(4): 223-231.

[80] Gupta A, Gartner J, Sethupathy P, et al. Anti-apoptotic function of a microRNA encoded by the HSV-1 latency-associated transcript [J]. Nature, 2006, 442(7098): 82-85.

[81] Dunn W, Trang P, Zhong Q, et al. Human cytomegalovirus expresses novel microRNAs during productive viral infection [J]. Cellular microbiology, 2005, 7(11): 1684-1695.

[82] Lewis B P, Burge C B, Bartel D P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets [J]. Cell, 2005, 120(1): 15-20.

[83] Henry S D, van der Wegen P, Metselaar H J, et al. Simultaneous targeting of HCV replication and viral binding with a single lentiviral vector containing multiple RNA interference expression cassettes [J]. Molecular Therapy, 2006, 14(4): 485-493.

[84] Jopling C L, Yi M, Lancaster A M, et al. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA [J]. Science, 2005, 309(5740): 1577-1581.

[85] T-shirt G F B. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs' [J]. Nature, 2005, 438(685-689).

[86]陈忠斌，于乐成，王升启. RNA干扰作用(RNAi)研究进展[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2002, 18(5): 525-528.

[87]朱睿， 张开立，邹向阳. RNA干扰(RNAi) 技术及其在功能基因组学研究中的应用[J]. 大连医科

大学学报, 2003, 25(2): 105-107.

[88]张峰，刘晔，刘三光, et al. RNA干预研究及其在肿瘤基因治疗中的应用[J]. 中华实验外科杂志, 2006, 23(3): 381-382.

[89] Saxena S, Jónsson Z O, Dutta A. Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress

Translation implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells [J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(45): 44312-44319.

[90] Schwarz D S, Hutvágner G, Du T, et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex [J]. Cell, 2003, 115(2): 199-208.

[91] Tuschl T. Expanding small RNA interference [J]. Nature biotechnology, 2002, 20(5): 446.

[92] Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R. A system for s表expression of short interfering RNAs in mammalian cells [J]. Science, 2002, 296(5567): 550-553.

[93] Lee N S, Dohjima T, Bauer G, et al. Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells [J]. Nature biotechnology, 2002, 20(5): 500-505.

[94] Han S-o, Mahato R I, Sung Y K, et al. Development of biomaterials for gene therapy [J]. Molecular Therapy, 2000, 2(4): 302-317.

[95] Hu W-Y, Myers C P, Kilzer J M, et al. Inhibition of retroviral pathogenesis by RNA interference [J]. Current Biology, 2002, 12(15): 1301-1311.

[96] Zhou H, Jin M, Yu Z, et al. Effective small interfering RNAs targeting matrix and nucleocapsid protein gene inhibit influenza A virus replication in cells and mice [J]. Antiviral research, 2007, 76(2): 186-193.

[97] Zamore P D. RNA interference: listening to the sound of silence [J]. Nature structural & molecular biology, 2001, 8(9): 746-750.

[98]康洁，刘福林. RNAi的抗病毒作用及其机制[J]. 现代免疫学, 2004, 24(5): 439-440.

[99] Grishok A, Pasquinelli A E, Conte D, et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control C. elegans developmental timing [J]. Cell, 2001, 106(1): 23-34.

[100]韩晓荣，柳纪省， 杨彬，et al. 亚洲1型口蹄疫病毒反义核酸双向表达载体的构建[J]. 动物医

学进展, 2008, 29(3): 1-5.

[101] Chen W, Yan W, Du Q, et al. RNA interference targeting VP1 inhibits foot-and-mouth disease virus replication in BHK-21 cells and suckling mice [J]. Journal of Virology, 2004, 78(13): 6900-6907.

[102]张伟，王承宇，杨松涛, et al. NP基因特异性干扰RNA抑制H5N1高致病性禽流感病毒复制的研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2009, 4(10): 726-729.

[103]王舰，罗恩杰. RNAi的作用机制及其在抗病毒领域的应用[J]. 微生物学杂志, 2006, 26(1): 93-97.

[104]连冬生，赵树进. RNAi在抗病毒领域的应用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2009, 12): 1069-1076.

[105] Pfeffer S, Zavolan M, Grässer F A, et al. Identification of virus-encoded microRNAs [J]. Science, 2004, 304(5671): 734-736.

[106] Zheng D-P, Ando T, Fankhauser R L, et al. Norovirus classification and proposed strain nomenclature [J]. Virology, 2006, 346(2): 312-323.

[107] Wu P, Han S, Chen T, et al. Involvement of microRNAs in infection of silkworm with *Bombyx mori cytoplasmic polyhedrosis* virus (BmCPV) [J]. PloS one, 2013, 8(7): e68209.

[108] Langmead B, Trapnell C, Pop M, et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome [J]. Genome Biol, 2009, 10(3): R25.

[109] Dsouza M, Larsen N, Overbeek R. Searching for patterns in genomic data [J]. Trends in Genetics, 1997, 13(12): 497-498.

[110] Jones-Rhoades M W, Bartel D P. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA [J]. Molecular cell, 2004, 14(6): 787-799.

[111] Hofacker I L, Fontana W, Stadler P F, et al. Fast folding and comparison of RNA secondary structures [J]. Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly, 1994, 125(2): 167-188.

[112] Zhao Y, Huang Y, Gong Z, et al. Automated and fast building of three-dimensional RNA structures [J]. Scientific Reports, 2012, 232-242.

[113] Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data [J]. Nucleic acids research, 2013, gkt1181.

[114] Kramer M F. Stem-loop RT-qPCR for miRNAs [J]. Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M Ausubel [et al], 2011, chapter 15(15.10.11-15.10.15.

[115] Torres A G. MicroRNA fate upon targeting with anti-miRNA oligonucleotides as revealed by an improved Northern-blot-based method for miRNA detection [J]. RNA (New York, NY), 2011, 17(5): 933-943.

[116] Singh J, Singh C, Bhavani A, et al. Discovering microRNAs from *Bombyx mori* nucleopolyhedrosis virus [J]. Virology, 2010, 407(1): 120-128.

[117] Chen X B, Zheng S D, Wu H. Role of microRNAs in endothelial function [J]. Chinese Medical Journal, 2013, 126(9): 1779-1786.

[118] Chaulk S G. Role of pri-miRNA tertiary structure in miR-17~92 miRNA biogenesis [J]. RNA biology, 2011, 8(6):

[119] Liu S, Li Q, Liu Z. Genome-wide identification, characterization and phylogenetic analysis of 50 catfish ATP-binding cassette (ABC) transporter genes [J]. PloS one, 2013, 8(5): e63895.

[120] Dzirasa K, Krishnan R R, Williams R S. Incubating the research independence of a medical scientist training program graduate: a case study [J]. Academic medicine: journal of the Association of American Medical Colleges, 2014,

[121] JF C. Mechanistic studies of phosphoserine phosphatase, an enzyme related to P-type ATPases \* [J]. The Journal of biological chemistry, 1999, 274(48): 33985-33990.

[122] Sharakhova M V, Hammond M P, Lobo N F, et al. Update of the Anopheles gambiae PEST genome assembly [J]. Genome biology, 8: R5(1):: R5.

[123] Cheng D, Peng J, Meng M, et al. Microarray Analysis of the Juvenile Hormone Response in Larval Integument of the Silkworm, *Bombyx mori* [J]. International journal of genomics, 2014, 2014(

[124] M R, G T, C U, et al. Thrombospondin-1/HIV-1 tat protein interaction: modulation of the biological activity of extracellular Tat [J]. FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2000, 14(13): 1917-1930.

[125] Wang X, Gao K, Wu P, et al. Molecular cloning of a phosphotriesterase-related protein gene of silkworm and its expression analysis in the silkworm infected with *Bombyx mori cytoplasmic polyhedrosis* virus [J]. Agricultural Sciences, 2011, 4): 406-412.

[126]İzzetoğlu S, Karacali S. The determination of N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) and N-glycolyl-neuraminic acid (Neu5Gc) types of sialic acids in hematopoietic organ of the silkworm, *bombyx mori* L (Lepidoptera: Bombycidae) [J]. KafkasÜniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2012, 18(147-150).

[127] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell, 2004, 116(2): págs. 281-297.

[128]焦晶凯，莫蓓红，高红艳. microRNA功能研究新进展[J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(2): 45-49.

[129] Cokus S J, Feng S, Zhang X, et al. Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning [J]. Nature, 2008, 452(7184): 215-219.

[130] Cummins J M, He Y, Leary R J, et al. The colorectal microRNAome [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(10): 3687-3692.

[131] Allmer J. Computational and Bioinformatics Methods for MicroRNA Gene Prediction [J]. Methods in Molecular Biology, 2014, 1107(157-175).

[132] Mendes N, Freitas A T, Sagot M-F. Current tools for the identification of miRNA genes and their targets [J]. Nucleic acids research, 2009, 37(8): 2419-2433.

[133] Reczko M, Maragkakis M, Alexiou P, et al. Accurate microRNA target prediction using detailed binding site accessibility and machine learning on proteomics data [J]. Front Genet, 2012, 2: 103.

[134] Luo X, Zhang J, Wang H, et al. PolyA RT-PCR-based quantification of microRNA by using universal TaqMan probe [J]. Biotechnology letters, 2012, 34(4): 627-633.

[135] Degliangeli F. Absolute and direct microRNA quantification using DNA-gold nanoparticle probes [J]. Journal of the American Chemical Society, 2014, 136(6): 2264-2267.

[136] Chen C, Ridzon D A, Broomer A J, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem–loop RT–PCR [J]. Nucleic acids research, 2005, 33(20): e179-e179.

[137] Liu W, Saint D A. Validation of a quantitative method for real-time PCR kinetics [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2002, 294(2): 347-353.

[138] Cai X, Schäfer A, Lu S, et al. Epstein–Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed [J]. PLoS pathogens, 2006, 2(3): e23.

[139] Cui C. Prediction and identification of herpes simplex virus 1-encoded microRNAs [J]. Journal of Virology, 2006, 80(11):: 5499–5508.

[140] John B, Enright A J, Aravin A, et al. Human microRNA targets [J]. PLoS Biology, 2004, 2(11): e363.

[141] Maragkakis M, Reczko M, Simossis V A, et al. DIANA-microT web server: elucidating microRNA functions through target prediction [J]. Nucleic acids research, 2009, gkp292.

[142] Lewis B P, JonesRhoades M W, Burge C B, et al. Prediction of mammalian microRNA targets [J]. Cell, 2003, 115(7): págs. 787-798.

[143] Rusinov V, Baev V, Minkov I N, et al. MicroInspector: a web tool for detection of miRNA binding sites in an RNA sequence [J]. Nucleic acids research, 2005, 33(suppl 2): W696-W700.

[144] Kim S-K, Nam J-W, Rhee J-K, et al. miTarget: microRNA target gene prediction using a support vector machine [J]. BMC bioinformatics, 2006, 7(1): 411.

[145] Loher P, Rigoutsos I. Interactive exploration of RNA22 microRNA target predictions [J]. Bioinformatics, 2012, 28(24): 3322-3323.

[146] Thadani R, Tammi M T. MicroTar: predicting microRNA targets from RNA duplexes [J]. BMC bioinformatics, 2006, 7(Suppl 5): S20.

[147] Krüger J, Rehmsmeier M. RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible [J]. Nucleic acids research, 2006, 34(suppl 2): W451-W454.

[148] Umbach J L, Kramer M F, Jurak I, et al. MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs [J]. Nature, 2008, 454(7205): 780-783.

[149] Hsieh W J, Lin F M, Huang H D, et al. Investigating microRNA-target interaction-supported tissues in human cancer tissues based on miRNA and target gene expression profiling [J]. PloS one, 2014, 9(4): e95697.

[150] Yan J, Gao G. MicroRNAs: the novel targets for *Ebola* drugs [J]. Science China-life Sciences, 2014, 57(10): 985-986.

[151] Shi S-J, Zhong Z-R, Liu J, et al. Solid lipid nanoparticles loaded with anti-microRNA oligonucleotides (AMOs) for suppression of microRNA-21 functions in human lung cancer cells [J]. Pharmaceutical research, 2012, 29(1): 97-109.

[152]Ørom U A, Kauppinen S, Lund A H. LNA-modified oligonucleotides mediate specific inhibition of microRNA function [J]. Gene, 2006, 372(137-141).

[153] Moens U. Silencing viral microRNA as a novel antiviral therapy[J]. BioMedResearchInternational, 2009, (200-209).

[154] H H. [Identification of novel therapeutically effective antibiotics using silkworm infection model] [J]. Yakugaku Zasshi, 2012, 132(1): 79-84.

[155] Bustin S, Benes V, Nolan T, et al. Quantitative real-time RT-PCR–a perspective [J]. Journal of molecular endocrinology, 2005, 34(3): 597-601.

[156] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2−ΔΔCT method [J]. METHODS, 2001, 25(4): 402-408.

[157] Damania P. Hepatitis B virus induces cell proliferation via HBx-induced microRNA-21 in hepatocellular carcinoma by targeting programmed cell death protein4 (PDCD4) and phosphatase and tensin homologue (PTEN) [J]. PloS one, 2014, 9(3): e91745.

[158] Ahlquist P. RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing [J]. Science, 2002, 296(5571): 1270-1273.

[159] Weiler J, Hunziker J, Hall J. Anti-miRNA oligonucleotides (AMOs): ammunition to target miRNAs implicated in human disease[J]. Genetherapy, 2005, 13(6): 496-502.

[160] Lu Y, Xiao J, Lin H, et al. A single anti-microRNA antisense oligodeoxyribonucleotide (AMO) targeting multiple microRNAs offers an improved approach for microRNA interference [J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37(3): e24.

[161]张勇， 吕延杰，杨宝峰. MicroRNA在人类疾病中的作用及其作为靶点的小分子药物设计[J].

药学学报, 2007, 42(11): 1115-1121.

[162] Sharifi M, Salehi R, Gheisari Y, et al. Inhibition of microRNA miR-92a induces apoptosis and necrosis in human acute promyelocytic leukemia [J]. Advanced biomedical research, 2014, (233-243).

[163] Hutvágner G, Mclachlan J, Pasquinelli A E, et al. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA [J]. Science, 2001, 293(5531): 834-838.

[164] Hutvágner G, Zamore P D. RNAi: nature abhors a double-strand [J]. Current opinion in genetics & development, 2002, 12(2): 225-232.

[165] Li G, Jiang G, Lu J, et al. Inhibition of hepatitis B virus cccDNA by siRNA in transgenic mice [J]. Cell biochemistry and biophysics, 2014,

[166] Wheeler L A. Silencing Sexually Transmitted Infections: Topical siRNA-Based Interventions for the

Prevention of HIV and HSV [J]. Infectious Diseases in Obstetrics & Gynecology, 2014, 2014(125087).

[167] He Y, Cao W, Pan S, et al. Inhibition of canine parvovirus replication in cultured cells by small interfering RNAs expressed from plasmid vectors [J]. Antiviral research, 2012, 95(3): 237-241.

[168] Yin R, Ding Z, Liu X, et al. Inhibition of Newcastle disease virus replication by RNA interference targeting the matrix protein gene in chicken embryo fibroblasts [J]. Journal of virological methods, 2010, 167(1): 107-111.

[169]夏定国. RNA干扰介导抑制家蚕核型多角体病毒BmNPV增殖的研究[D] [J]. 方法, 2006, 42-45.

[170] Terenius O, Papanicolaou A, Garbutt J S, et al. RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design [J]. Journal of insect physiology, 2011, 57(2): 231-245.

[171] Price D R, Gatehouse J A. RNAi-mediated crop protection against insects [J]. Trends in biotechnology, 2008, 26(7): 393-400.

[172]刘卫星， 孟祥坤， 薛仁宇，et al. 家蚕质型多角体病毒苏州株基因组片段2 的克隆与分析[J].

江苏农业科学, 2011, 001）: 19-23.

[173] Brass V, Gouttenoire J, Wahl A, et al. Hepatitis C virus RNA replication requires a conserved structural motif within the transmembrane domain of the NS5B RNA-dependent RNA polymerase [J]. Journal of Virology, 2010, 84(21): 11580-11584.

[174] Hamamoto H, Urai M, Paudel A, et al. [Identification of novel therapeutically effective antibiotics using silkworm infection model] [J]. Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, 2011, 132(1): 79-84.

[175] Elbashir S M, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21-and 22-nucleotide RNAs [J]. Genes & development, 2001, 15(2): 188-200.

[176] Chen Y, Wang X F, Huang Y, et al. Chemically modified siRNAs and their conjugates [J]. 中国 药

学（英文版）, 2012,

[177] Kilcher S, Schmidt F I, Schneider C, et al. siRNA screen of early poxvirus genes identifies the AAA+ ATPase D5 as the virus genome-uncoating factor [J]. Cell host & microbe, 2014, 15(1): 103-112.

[178] Novina C D, Murray M F, Dykxhoorn D M, et al. siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection [J]. Nature medicine, 2002, 8(7): 681-686.

[179] McCaffrey A P, Nakai H, Pandey K, et al. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference [J]. Nature biotechnology, 2003, 21(6): 639-644.

[180] Isobe R, Kojima K, Matsuyama T, et al. Use of RNAi technology to confer enhanced resistance to BmNPV on transgenic silkworms [J]. Archives of virology, 2004, 149(10): 1931-1940.

[181] Schwartz S, Vergoulidou M, Schreier E, et al. Norovirus gastroenteritis causes severe and lethal complications after chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation [J]. Blood, 2011, 117(22): 5850-5856.

[182] Novina C D, Sharp P A. The rnai revolution [J]. Nature, 2004, 430(6996): 161-164.

[183] Consortium I S G. The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori* [J]. Insect Biochemistry & Molecular Biology, 2008, 38(12): 1036–1045.

[184] Barman T K, Arora P, Rao M, et al. Utilization of *Bombyx mori* larvae as a surrogate animal model for evaluation of the anti-infective potential of oxazolidinones [J]. Journal of Infection and Chemotherapy, 2008, 14(2): 166-169.

[185] Velkov T, Carbone V, Akter J, et al. The RNA-Dependent-RNA Polymerase, an Emerging Antiviral Drug Target for the Hendra Virus [J]. Current Drug Targets, 2014, 15(1): 103-113(111).

[186] Lu A, Zhang H, Zhang X, et al. Attenuation of SARS coronavirus by a short hairpin RNA expression plasmid targeting RNA-dependent RNA polymerase [J]. Virology, 2004, 324(1): 84-89.

[187] Birmingham A, Anderson E M, Reynolds A, et al. 3′UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets [J]. Nature methods, 2006, 3(3): 199-204.

[188] Kann R K. Association between feline immunodeficiency virus (FIV) plasma viral RNA load, concentration of acute phase proteins and disease severity [J]. Veterinary Journal, 2014, 201(2): 181–183.

[189] Tellinghuisen J, Spiess A N. Comparing real-time quantitative polymerase chain reaction analysis methods for precision, linearity, and accuracy of estimating amplification efficiency [J]. Analytical Biochemistry, 2014, 449(6): 76-82.

[190] Gandhe A S, John S H, Nagaraju J. Noduler, a novel immune up-regulated protein mediates nodulation response in insects [J]. The Journal of Immunology, 2007, 179(10): 6943-6951.

[191] Mrinal N, Nagaraju J. Intron Loss Is Associated with Gain of Function in the Evolution of the Gloverin Family of Antibacterial Genes in *Bombyx mori* \* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(34): 23376-23387.

[192]黄浮. 蚕体解剖生理学[M]. 北京：中国农业出版社. 1995, pp56-76

[193]缪云根. 昆虫转座子及在家蚕中的应用[J]. 蚕桑通报, 2004, 35(2): 6-10.

[194] Uchino K, Imamura M, Shimizu K, et al. Germ line transformation of the silkworm, Bombyx mori, using the transposable element Minos [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2007, 277(3): 213-220.

[195]周启升，于奇，刘庆信. 转基因家蚕的研究进展及应用前景[J]. 昆虫学报, 2011, 1（1）：

[196] Cullen B R. RNAi the natural way [J]. Nature genetics, 2005, 37(11): 1163-1166.

[197] Shuey D J, McCallus D E, Giordano T. RNAi: gene-silencing in therapeutic intervention [J]. Drug discovery today, 2002, 7(20): 1040-1046.

[198]刘雄涛. 腺病毒载体介导的shRNA沉默人心房肌细胞GIRK4基因的实验研究[D]；第四军医大学, 2008。

[199] Miyagishi M, Taira K. U6 promoter–driven siRNAs with four uridine 3′overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells [J]. Nature biotechnology, 2002, 20(5): 497-500.

[200] Zhu J, Zhou K, Hao J-J, et al. Regulation of cortactin/dynamin interaction by actin polymerization during the fission of clathrin-coated pits [J]. Journal of cell science, 2005, 118(4): 807-817.

[201] MangéA, Julien E, Prudhomme J C, et al. A strong inhibitory element down-regulates SRE-stimulated transcription of the A3 cytoplasmic actin gene of Bombyx mori [J]. Journal of molecular biology, 1997, 265(3): 266-274(269).

[202] Seidl C I, Lama L, Ryan K. Circularized synthetic oligodeoxynucleotides serve as promoterless RNA polymerase III templates for small RNA generation in human cells [J]. Nucleic acids research, 2013, 41(4): 2552-2564.

[203] Han J, Huez G, Beutler B. Interactive effects of the tumor necrosis factor promoter and 3'-untranslated regions [J]. The Journal of Immunology, 1991, 146(6): 1843-1848.

[204]姚纪花. 斑马鱼中siRNA介导的RNA干扰及DEC1/Sharp2/Stral3基因的克隆和功能研究[D];

复旦大学, 2005.

[205]程道军， 唐林， 孟勐，et al. 家蚕蛹期特异基表达因BmCP283鉴定及其启动子的克隆分析[J].

中国农业科学, 2013, 46(11):

[206]康丽霞，孟勐，王永虎, et al. 家蚕蛹期特异基因BmCP283的启动子活性分析[J]. 蚕业科学, 2013, 5): 881-886.

[207]陆改，程廷才， 蒋亮，et al. 家蚕中肠特异启动子BmAPN 的克隆及活性分析[J]. 中国农业科

学, 2012, 45(20): 4279-4287.

[208] Hwang Y S, Yang D, Mccullar C, et al. Analysis of the rice endosperm-specific globulin promoter in transformed rice cells [J]. Plant Cell Reports, 2002, 20(9): 842-847.

[209] Li L, Wang X, Gai J, et al. Isolation and characterization of a seed-specific isoform of microsomal omega-6 fatty acid desaturase gene (FAD2-1B) from soybean [J]. Dna Seq, 2008, 19(1): 28-36.

[210] Kluth A, Sprunck S, Becker D, et al. 5′deletion of a gbss1 promoter region from wheat leads to changes in tissue and developmental specificities [J]. Plant Molecular Biology, 2002, 49(6): 665-678(614).

[211] Louis C J. The Species non-Specificity of Globulins in the Globulin-Fluorescein Staining of Tissues [J]. Br J Cancer, 1958, 12(1): 5-12.

[212] Giering J C, Grimm D, Storm T A, et al. Expression of shRNA from a tissue-specific pol II promoter is an effective and safe RNAi therapeutic [J]. Molecular Therapy, 2008, 16(9): 1630-1636.

[213]刘明，刘国庆. RNA干扰的应用及其意义[J]. 生物学通报, 2005, 40(6): 1-3.

[214]陆改. 家蚕中肠特异启动子的克隆和鉴定[D]；西南大学, 2012。

[215] Jiang L, Cheng T, Dang Y, et al. Identification of a midgut-specific promoter in the silkworm" *Bombyx mori*" [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2013, 433(4): 542-546.

[216]周芳. 靶向基因shRNA干扰家蚕及猪若干病毒的复制和增殖研究[D]；浙江大学, 2012。

[217]周文林，曹广力，薛仁宇, et al. 家蚕丝素蛋白轻链基因(fib-L) 启动子序列的克隆及其活性分析[J]. 昆虫学报, 2007, 50(6): 547-554.

[218]刘岩，孟智启，何丽华, et al. 两种抽提家蚕基因组DNA方法的比较[J]. 蚕桑通报, 2008, 39(4): 23-26.

[219] Summers M D, Smith G E. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures [J]. Bulletin B-Texas Agricultural Experiment Station (USA), 1987,

[220]潘敏慧，刘敏，刘佳, et al. 阳离子脂质体转染家蚕培养细胞的技术体系研究[J]. 蚕业科学, 2009, 34(4): 684-688.

[221] Mike H, Natacha C, Annette L, et al. The importance of RT-qPCR primer design for the detection of siRNA-mediated mRNA silencing [J]. BMC Research Notes, (145-154)

[222]徐汉福， 夏庆友， 刘春, et al. 家蚕转基因载体pBacA3EG 的构建及其表达[J]. 昆虫学报,

2005, 48(5): 799-803.

[223]周文林，王崇龙，刘波, et al. *piggyBac*转座子介导的家蚕细胞转基因研究初探[J]. 蚕业科学, 2007, 33(1): 30-35.

[224]王云， 叶向群， 吴亦亮，et al. 四种启动子调控RFP报告基因在家蚕细胞(Bm-e-HNU5)内的瞬

时表达[J]. 昆虫学报, 2006, 49(2): 167-171.

[225] Bridge A J, Pebernard S, Ducraux A, et al. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells [J]. Nature genetics, 2003, 34(3): 263-264.

[226] Fourney R, Miyakoshi J, Day Iii R, et al. Northern blotting: efficient RNA staining and transfer [J]. Focus, 1988, 10(1): 5-7.

[227] Palliser D, Chowdhury D, Knipe D M, et al. An siRNA-based microbicide protects mice from lethal herpes simplex virus 2 infection [J]. Nature International Weekly Journal of Science, 2006, 439(7072): págs. 89-94.

[228] An D S, Qin F X-F, Auyeung V C, et al. Optimization and functional effects of s表short hairpin

RNA expression in primary human lymphocytes via lentiviral vectors [J]. Molecular Therapy, 2006, 14(4): 494-504.

**攻读学位期间发表的学术论文和成果**

1. **Pan, Z. -H.**, Gao, K., Hou, C. -X., Wu, P., Qin, G. -X., Geng, T. and Guo, X. -J., DsRNA interference on expression of a RNA-dependent RNA polymerase gene of *Bombyx mori cytoplasmic polyhedrosis* virus. *Gene* 2015, 565(1):56-61

2. **潘中华**郭锡杰耿涛吴萍沈中元朱峰发明名称：一种应用于检测家蚕质型多角体病毒的检测引物及检测工艺国家发明专利授权专利号：ZL 201210452774.9

3. **Pan, Z. -H.**, Gao, K., Hou, C. -X., Wu, P., Qin, G. -X., Geng, T. and Guo, X. -J., 2015. Characterization of two microRNAs encoded by *Bombyx mori cytoplasmic polyhedrosis* virus. *Journal of Invertebrate Pathology*.已投稿，修改未拒稿

致 **谢**

本论文是在导师郭锡杰研究员悉心指导下完成的。从论文的选题、实验的过程到论文的写作都凝聚着导师的心血。在博士学习、科研工作和生活中，导师更是给予了无私的帮助、支持、理解和宽容。在本文完成之际，我谨向尊敬的郭老师表示崇高的敬意和衷心的感谢！导师严谨的治学态度、渊博的专业知识、兢业的工作作风及豁达的为人处事时刻激励着我，是我永远的学习楷模！使我受益终生！

论文在完成过程中得到了江苏科技大学蚕研所病理室沈中元研究员、秦光星副研究员、钱荷英老师、侯成香老师、高坤老师、吴萍老师的大力支持，慷慨地提供了病毒及实验场地，指导添毒方法和相关知识等。在此表示衷心的感谢。

感谢我的博士生师兄耿涛，帮助购买试剂并指导仪器的使用和维护。感谢本实验室的研究生施莉莉、黄玉霞、尚梦珂等同学在我整个实验过程中的帮助和支持。

感谢含辛茄苦的父母，感谢他们一直以来无条件的支持和爱。感谢我的夫人和我的女儿，感谢他们对我的理解、支持。

最后感谢评阅论文和出席博士论文答辩的诸位专家、教授，感谢你们在百忙之中给予的悉心指导！

附录一**Abbreviations list**

AIV avian influenza virus

AMOs anti-miRNA oligo nucleotides

Amp ampicillin

BLV牛白血病病毒

BmCPV *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus

BmCPV-RDRP *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus RNA-dependent RNA polymerase

BmNPV *Bombyx mori* Nucleopolyhedro virus

CDNA complementary DNA

CPV cytoplasmic polyhedrosis virus

CTL Cytotoxic T cell

deadenylation脱腺嘌呤反应

DENV登革热病毒

DEPC diethylpyrocarbonate

DNV Densonucleosis Virus

DsRNAs double-stranded RNAs

EB溴乙锭

EDTA四乙酸二氨基乙烷

FMDV Foot-and-mouth disease virus

HCMV Human cyto megalo virus

HCV hepatitis C virus

HIV human immunodeficiency virus

LNA Locked Nucleic Acid

miRNA MicroRNA

NPV nuclear polyhedrosis virus

NK natural killer cell

OD optical density

PABP poly A binding protein

PAGE Polyacylamide Gel Electrophoresis

PCR polymerase chain reaction

RDRP RNA-dependent RNA polymerase Real-time PCR实时定量荧光PCR

RISC RNA-induced silencing complex

RNA ribonucleic acid

RNAi RNA interference

RT-qPCR quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

SDS十二烷基磺酸钠

ShRNA short hairpin RNA

SiRNA Small interfering RNA

Ss single stranded

SV40 Simian virus40

TGF-βtransforming growth factor-β

UTR untranslated region

VmiRNA Viral miRNA

WNV西尼罗河病毒