

学校代码: 10285

学 号: 20164221040

苏州大学  
SOOCHOW UNIVERSITY

# 硕士学位论文

(学术学位)



BmCPV感染对家蚕circRNAs表达的影响  
及circRNA\_5655的功能

Response of circRNAs expression to BmCPV infection and  
the function-of circRNA 5655 in silkworm, *Bombyx mori*

研究生姓名 王章艳  
指导教师姓名 贡成良  
专业名称 生物化学与分子生物学  
研究方向 基因功能研究  
所在院部 基础医学与生物科学学院  
论文提交日期 2019年06月

## 苏州大学学位论文独创性声明

本人郑重声明：所提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，本论文不含其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果，也不含为获得苏州大学或其它教育机构的学位证书而使用过的材料。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人承担本声明的法律责任。

论文作者签名： 王莹 日期： 2019.6.13

## 苏州大学学位论文使用授权声明

本人完全了解苏州大学关于收集、保存和使用学位论文的规定，即：学位论文著作权归属苏州大学。本学位论文电子文档的内容和纸质论文的内容相一致。苏州大学有权向国家图书馆、中国社科院文献信息情报中心、中国科学技术信息研究所（含万方数据电子出版社）、中国学术期刊（光盘版）电子杂志社送交本学位论文的复印件和电子文档，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存和汇编学位论文，可以将学位论文的全部或部分内 容编入有关数据库进行检索。

涉密论文

本学位论文属 \_\_\_\_\_ 在 \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月解密后适用本规定。

非涉密论文

论文作者签名：   琮   日期：   2019.6.13  

导师签名：   王   日期：   2019.6.13

## 中文摘要

随着 RNA-seq 技术的发展, 环状 RNA(circRNA)作为一种新式非编码 RNA 被推至公众视野下。circRNA 是通过“头到尾”反向剪接从典型的剪接体中产生的, 具有一定的组织和发育阶段特异性。迄今为止, circRNA 的一些功能已经得到确认, 它能够充当 miRNA 海绵以调控靶基因表达、参与调控转录过程、与自身 mRNA 的经典剪接相竞争、与蛋白质互动, 并具有编码蛋白的潜能。家蚕是鳞翅目昆虫的典型代表, 具有重要的农业和经济意义。家蚕质型多角体病毒 (*Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus, BmCPV) 能特异地感染家蚕的中肠上皮细胞, 引发家蚕中肠型脓病, 危害养蚕业。circRNA 在调节真核生物的基因表达、调控生长发育和病理进程中发挥重要作用, 但是关于家蚕 circRNAs 表达对 BmCPV 的感染应答及家蚕 circRNAs 的功能尚未可知。

本研究采用高通测序法测定正常中肠组织(对照)和 BmCPV 感染的中肠组织(试验)中家蚕 circRNAs 的表达谱。从对照和试验样品中分别检测到了 9753 和 7475 个 circRNAs, 其中共表达的 circRNAs 有 6085 个, 在对照和试验样品中分别有 646 和 737 个 circRNAs 特异性表达。共检测到差异表达 circRNAs 3638 个, 其中 400 个 circRNAs 差异表达倍数变化  $\geq 2.0$  ( $p < 0.05$ ,  $FDR < 0.05$ ), 病毒感染后 294 个上调, 106 个下调。通过 GO 和 KEGG 富集分析大体上注释了差异表达 circRNAs 亲本基因的主要功能。基于差异表达的 circRNAs 与 microRNA(miRNA)结合位点之间的相关性分析, 构建 circRNA-miRNA 相互作用网络, 推断出了 13 个 miRNAs 与 193 个 circRNAs 间的相互作用。bmo-miR-3389-5p, bmo-miR-745-3p 和 bmo-miR-3262 分别与 30, 34 和 34 个 circRNAs 互作。circRNA\_8115, circRNA\_9444, circRNA\_4553, circRNA\_0827 和 circRNA\_6649 分别含有 6、5、4、4 和 4 个 miRNA 结合位点。同时还发现 circRNAs 选择性环化是家蚕的普遍特征, 许多家蚕 circRNAs 的 junction 位点侧序列符合典型的 GT/AG 剪接信号。

家蚕 circRNA\_5655 序列长度为 563bp, 由家蚕 histone-lysine N-methyltransferase eggless (LOC101742950) 基因的第 9-13 外显子环化而成。RT-qPCR 结果显示过表达 circRNA\_5655 后其亲本基因 LOC101742950 的转录水平

显著降低, 但 Western blotting 检测结果显示组蛋白甲基化水平却有所升高。细胞免疫荧光结果显示, circRNA\_5655 在核、质中均有分布, 而 circRNA\_5655 与家蚕 NF90 蛋白具有非序列依赖性共定位。通过 circRNA-miRNA pull down 和双荧光素报告系统证实, circRNA\_5655 能够起到 bmo-miR-3391-5p 海绵作用, 从而激活下游靶基因家蚕组蛋白去乙酰化酶 Rpd3(*Bombyx mori* histone deacetylase Rpd3, XM\_004931383.2)和家蚕神经肽受体 A35(*Bombyx mori* neuropeptide receptor A35, NM\_001134279.1)的表达。通过 RT-qPCR 检测过表达 circRNA\_5655 细胞中凋亡相关基因的表达水平, 发现过表达 circRNA\_5655 可导致家蚕 p53 样蛋白基因(*Bombyx mori* p53-like protein mRNA, KC243147.1)、家蚕信号转导和转录激活因子 *STAT* 基因(*Bombyx mori* signal transducer and activator of transcription, NM\_001163916.1)、家蚕 *survivin-1* 基因(*Bombyx mori* survivin-1, XM\_012688679.2)表达水平下调 ( $p < 0.05$ )。流式细胞术显示, 过表达 circRNA\_5655 促进细胞增殖并抑制细胞凋亡。通过 circRNA-protein pull down 和质谱鉴定发现, circRNA\_5655 可能与线粒体硫胺素焦磷酸盐载体、琥珀酸脱氢酶组装因子 2-B、动力蛋白  $\beta$  链等蛋白质相互作用。另外, 我们还发现过表达 circRNA\_5655 对 BmCPV 增殖复制有抑制作用, 但随着 circRNA\_5655 浓度的增加抑制减弱。

生物信息学分析结果显示, circRNA\_5655 具有 m6A 甲基化修饰位点 (GGACC), 并且包含一个跨 circRNA\_5655 反向剪接位点的开放阅读框 ORF1, 可能编码含有 122 个氨基酸残基的蛋白 circR-P122。合成其特异性小肽 RRNSVRTNASARSRFAC, 并制备兔源多克隆抗血清, 用 Western Blotting 可在家蚕中肠中检测到 circR-P122 蛋白的表达。BmN 细胞和家蚕中肠组织的免疫荧光结果显示, circR-P122 主要定位于细胞质中。Western blotting 结果显示, 过表达 circR-P122 蛋白后组蛋白甲基化水平有所抑制。

**关键词:** 家蚕; circRNAs; 高通量测序; BmCPV; miRNA 海绵; 编码蛋白

**作者:** 王章艳

**指导老师:** 贡成良

# Response circRNAs expression to BmCPV infection and the function of circRNA\_5655 in silkworm, *Bombyx mori*

## Abstract

With the development of RNA-seq technology, circular RNA (circRNA) has been pushed into the public view as a new type of non-coding RNA. CircRNA produced from a typical spliceosome by "head-to-tail" back splicing, and it has tissue and developmental stage specificity. To date, some functions of circRNA have been identified, which can act as miRNA sponges to regulate target gene expression, participate in the regulation of transcriptional processes, compete with classical splicing of self-mRNA, interact with proteins, and have the potential to encode proteins. Silkworm is a typical representative of lepidopteran insects and has important agricultural and economic significance. *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus (BmCPV) can specifically infect the midgut epithelial cells of the silkworm, causing silkworm midgut polyhedrosis, which is harmful to the sericulture industry. CircRNA plays an important role in regulating gene expression, growth and pathogenesis in eukaryotes, but the infection response of circRNAs to BmCPV and the function of circRNAs in silkworm are not known.

In this study, high-throughput sequencing was used to determine the expression profiles of silkworm circRNAs in normal midgut tissues (control) and BmCPV-infected midgut tissues (test). 9753 and 7475 circRNAs were detected from the control and test samples, respectively, of which 6085 were co-expressed circRNAs. 646 and 737 circRNAs were specifically expressed in the control and test samples, respectively. A total of 3638 circRNAs were differentially expressed, of which 400 circRNAs showed differential expression fold change  $\geq 2.0$  ( $p < 0.05$ , FDR  $< 0.05$ ), 294 were up-regulated and 106 were down-regulated after viral infection. The main functions of the differentially expressed circRNAs parental genes were largely annotated by GO and KEGG enrichment analysis. Based on the correlation analysis between differential

expression of circRNAs and microRNA (miRNA) binding sites, a circRNA-miRNA interaction network was constructed to infer the interaction between 13 miRNAs and 193 circRNAs. bmo-miR-3389-5p, bmo-miR-745-3p and bmo-miR-3262 were associated with 30, 34 and 34 circRNAs, respectively. CircRNA\_8115, circRNA\_9444, circRNA\_4553, circRNA\_0827 and circRNA\_6649 contained 6, 5, 4, 4 and 4 miRNA binding sites, respectively. We further found that the alternative cyclization of circRNAs is a common feature of silkworm, and the junction sites of many silkworm circRNAs are flanked by the typical GT/AG splicing signal.

The silkworm circRNA\_5655 is 563 bp and is cyclized by the 9-13 exon of *Bombyx mori* histone-lysine N-methyltransferase eggless (LOC101742950) gene. In order to investigate the function and mechanism of the silkworm circRNA\_5655, RT-qPCR results showed that the transcription level of the parental gene LOC101742950 was significantly decreased after overexpression of circRNA\_5655, but the expression of histone methylation was increased by Western blotting. The results of immunofluorescence showed that circRNA\_5655 was distributed in both nucleus and cytoplasm, while circRNA\_5655 was colocalized with silkworm NF90 protein in a sequence-independent manner. It was confirmed that circRNA\_5655 can act as a bmo-miR-3391-5p sponge to activate the downstream target gene *Bombyx mori* histone deacetylase Rpd3 (XM\_004931383.2) expression by circRNA-miRNA pull down and dual fluorescein reporter system. RT-qPCR was used to detect the expression of apoptosis-related genes in overexpressing circRNA\_5655. It was found that overexpression of circRNA\_5655 resulted in the expression levels of *Bombyx mori* p53-like protein mRNA (KC243147.1), *Bombyx mori* signal transduction and transcription (NM\_001163916.1) and *Bombyx mori* survivin-1 gene (XM\_012688679.2) were down-regulated ( $p < 0.05$ ). Flow cytometry revealed that overexpression of circRNA\_5655 promoted cell proliferation and inhibited apoptosis. It was found by circRNA-protein pull down and mass spectrometry that circRNA\_5655 may interact with proteins such as mitochondrial thiamine pyrophosphate carrier, succinate dehydrogenase assembly factor 2-B, and dynein  $\beta$  chain. In addition, we also found that overexpression of circRNA\_5655 inhibited BmCPV proliferation and replication, but decreased with the increase of circRNA\_5655 concentration.

Bioinformatics analysis revealed that circRNA\_5655 has a m6A methylation

modification site (GGACC) and contains an open reading frame ORF1, which spanning the circRNA\_5655 back splicing site, possibly encoding the protein circR-P122 containing 122 amino acid residues. The specific small peptide RRNSVVRTNASARSRFAC was synthesized and rabbit polyclonal antiserum was prepared. Western Blotting could detect the expression of circR-P122 protein in the midgut of silkworm. Immunofluorescence of the BmN cells and the silkworm midgut tissue showed that circR-P122 was mainly localized in the cytoplasm. Western blotting results showed that the level of histone methylation was inhibited after overexpression of circR-P122 protein.

**Key words:** *Bombyx mori*; circRNAs; high-throughput sequencing; BmCPV; miRNA sponge; encoding protein

**Written by: Zhangyan Wang**

**Supervised by: Chengliang Gong**

# 目 录

第一章 文献综述 .....	1
1 circRNA 的研究进展 .....	1
1.1 circRNA 的类型及形成机制 .....	1
1.2 circRNA 的功能研究 .....	2
2 家蚕对 BmCPV 的感染应答 .....	5
2.1 家蚕 .....	5
2.2 家蚕病毒 BmCPV .....	6
2.3 家蚕对 BmCPV 的感染应答 .....	7
3 研究目的与研究内容 .....	8
3.1 研究目的和意义 .....	8
3.2 研究内容 .....	9
3.3 技术路线 .....	10
参考文献 .....	10
第二章 BmCPV 感染对家蚕中肠组织中 circRNAs 表达模式的影响 .....	15
1 引言 .....	15
2 材料与方法 .....	17
2.1 实验材料 .....	17
2.2 试剂配制 .....	17
2.3 实验方法 .....	19
3 结果与分析 .....	24
3.1 家蚕中肠 circRNAs 的特性 .....	24
3.2 差异表达 circRNAs 的线性转录本的注释及鉴定 .....	26
3.3 差异表达 circRNAs 亲本基因 GO 和 KEGG 通路分析 .....	28
3.4 circRNA-miRNA 互作网络的构建 .....	30
3.5 家蚕 circRNAs 的验证 .....	31
4 讨论 .....	34

参考文献.....	37
<b>第三章 家蚕 circRNA_5655 的功能及作用机制.....</b>	<b>40</b>
1 引言.....	40
2 材料与方法.....	42
2.1 实验材料.....	42
2.2 试剂配制.....	43
2.3 实验方法.....	44
3 结果与分析.....	58
3.1 circRNA_5655 的一般特性.....	58
3.2 circRNA_5655 的表达模式及对 BmCPV 的感染应答.....	59
3.3 体外转录法构建 circRNAs 及 circRNA_5655 表达载体的构建.....	61
3.4 circRNA_5655 对其亲本基因表达的影响.....	64
3.5 circRNA_5655 在 BmN 细胞中的定位及与蛋白 NF90 的共定位.....	66
3.6 circRNA_5655 竞争结合 miRNA 对下游靶基因的影响.....	68
3.7 circRNA_5655 对细胞免疫、凋亡相关基因表达的影响.....	71
3.8 circRNA_5655 对 BmCPV 增殖复制的影响.....	74
3.9 circRNA_5655 与蛋白的相互作用.....	77
4 讨论.....	78
参考文献.....	80
<b>第四章 circRNA_5655 具编码蛋白的功能.....</b>	<b>85</b>
1 引言.....	85
2 材料与方法.....	86
2.1 实验材料.....	86
2.2 试剂配制.....	87
2.3 实验方法.....	87
3 结果与分析.....	89
3.1 circRNA_5655 编码蛋白的潜在性预测及 Western blotting 验证.....	89
3.2 circRNA_5655 编码蛋白在 BmN 细胞及家蚕中肠中的免疫荧光定位.....	91
3.3 pIZT-ORF1 载体构建及 circRNA_5655 编码蛋白对 H3K9me3 的影响.....	93

4 讨论.....	96
参考文献.....	96
结 论.....	98
附录一 载体图谱.....	99
附录二 常用仪器.....	101
附录三 体内成环载体构建方案.....	102
附录四 RT-qPCR 原始数据.....	106
附录五 双荧光素酶报告系统原始数据.....	111
附录六 抗原肽合成及抗体效价.....	112
附录七 测序原始结果.....	114
附录八 质谱鉴定结果.....	117
附录九 缩略词表.....	118
致 谢.....	119

# 第一章 文献综述

## 1 circRNA 的研究进展

环状 RNA (circRNA) 是一类新式非编码 RNA, 与已知的线性 RNA 不同, 它是共价闭合的环状结构, 即通常存在于 RNA 分子中的 3' 和 5' 末端在 circRNA 中是相连的。这种特殊结构使其不易被 RNase R 和其他核酸外切酶降解<sup>[1,2]</sup>, 比线性 RNA 表达更加稳定。1979 年首次通过电子显微镜发现了 circRNA, 但在当时它被认为是低丰度的错误剪接的副产物<sup>[3]</sup>。随着 RNA-seq 技术的发展, circRNA 作为一种新型非编码 RNA 被推至公众视野下。后续研究发现, circRNA 是通过“头到尾”反向剪接从典型的剪接体中产生的, 其具有一定的组织和发育阶段特异性<sup>[4]</sup>, 并且单个基因可以产生一种以上含有外显子, 内含子或外显子-内含子的 circRNA。

### 1.1 circRNA 的类型及形成机制

产生 circRNAs 的途径有很多, 这主要取决于供体转录物的来源。如图 1-1, (a) 途径可产生外显子环状 RNA (circRNA)<sup>[5]</sup>, 它是通过非典型剪接 (即反向剪接) 形成的。其 5' 剪切位点 (5'ss, 供体位点) 与 3' 剪切位点 (3'ss, 受体位点) 通过独特的“头对尾”连接而成。此过程中 RNA 结合蛋白 (RBPs) 或作用因子能够将两个侧翼内含子桥接在一起, 然后去除内含子以形成 circRNA。(b) 途径可形成外显子-内含子环状 RNA (EIciRNA)<sup>[6]</sup>。Intron1 和 Intron3 中的反向互补序列 (紫色箭头标示) 可以进行配对, 使 Exon3 的 5'ss 与 Exon2 的 3'ss 相互靠近, 在 Exon2 和 Exon3 之间形成保留内含子的环化, 从而生成外显子-内含子 circRNA。此外, 与经典剪接相结合的反向剪接可能形成由 Exon2 和 Exon3 构成的多外显子 circRNA。(c) 途径可以形成内含子环状 RNA (ciRNA)<sup>[7]</sup>, 前体 mRNA 通过经典的剪接机制切除套索内含子, 并且共有 RNA 序列 (黄色条) 的存在避免了套索内含子的脱支以形成稳定的 ciRNA。

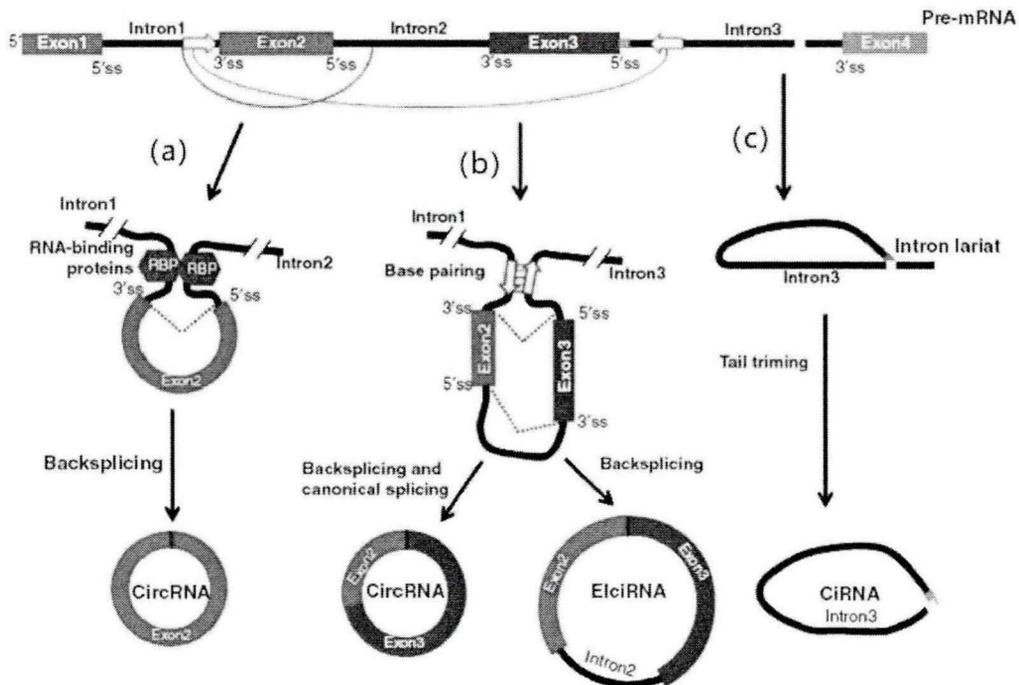


图 1-1 单个基因产生的不同类型 circRNAs

Fig 1-1 Different types of circRNAs produced by the single gene

### 1.2 circRNA 的功能研究

据报道，外显子-内含子环状 RNA (ElciRNA) 和内含子环状 RNA (ciRNA) 主要定位于细胞核<sup>[8,9]</sup>，而外显子 circRNA 主要被发现于细胞质中<sup>[10]</sup>。circRNA 的定位可能与其功能密切相关，迄今为止，circRNA 的一些功能已经得到确认。

#### 2.3.1 circRNA 充当 miRNA 海绵

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类小的 (大约 20nt 左右) 非编码 RNA，能与 mRNA 的 3' 非翻译区 (3'UTR) 相结合，从而抑制蛋白质翻译或促进 mRNA 降解<sup>[11]</sup>。一些环状 RNA 含有 miRNA 应答元件 (miRNA response element, MRE)，能够通过碱基互补配对与 miRNA 相结合，充当竞争性内源 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA)，从而解除 miRNA 对其下游靶基因的抑制，并上调靶基因的表达水平。这种海绵作用最有力的证据来源于 circRNA CiRS-7 的研究<sup>[12]</sup>，此环状 RNA 源于 CDK1 基因，其含有超过 70 个 miR-7 的潜在结合位点，可充当 ceRNA，成为 miR-7 的“超级海绵”以发挥特定的生物学效应。circCCDC66 能够通过抑制 miR-93，促进 c-MYC 表达，进一步促进细胞凋亡<sup>[13]</sup>。在肝癌 (HCC) 发生的进程中，环状 RNA circMTO1 可以充当 miR-9 的海绵，以抑制肝癌的发生<sup>[14]</sup>。

circMTO1 被证明在肝细胞肿瘤中是低表达的,是癌症理想的有价值的生物标志物。然而值得注意的是,虽然这种“海绵”作用机制是迄今为止研究最深入的,但这种调控的相对重要性仍然不明确,因为大多数 circRNA 不包含许多 miRNA 的潜在结合位点。

### 2.3.2 circRNA 参与调控转录过程

环状 RNA 可以通过与转录机制相互作用来调节亲本来源基因的表达水平。研究发现定位于细胞核的 EICiRNA 可与 RNA 聚合酶 II 结合并改变其转录活性。据报道,环状 RNA EICiEIF3J 能够与小核核糖核蛋白 U1 及 EIF3J 启动子序列相结合,顺式增强亲本基因 EIF3J 的转录水平<sup>[15]</sup>。例如,当 MBL 蛋白高表达于细胞内时,环状 RNA circMBL 可以与此亲本蛋白相结合起到负反馈调节作用,从而抑制 MBL 转录物的进一步产生<sup>[16]</sup>。

### 2.3.3 circRNA 生物发生与经典剪接相竞争

现在许多报道都专注于鉴定 circRNA 的转录功能,但是 circRNA 生物发生其本身可能就存在潜在的功能。大多数 circRNAs 来源于蛋白质编码外显子,其表达会竞争性影响前体转录本的经典剪接机制,从而导致亲本 mRNA 基因低水平表达。据报道, circRNA circMBL 与肌强直营养不良 (myotonic dystrophy, MD) 疾病的发生有关,其可通过调节前体 mRNA 的活性来调节 MBL mRNA 及 circMBL 的形成,这样参与肌强直性营养不良疾病发生的过程。circMBL 的反向剪接机制会与线性转录本 MBL 的经典剪接机制发生转录竞争<sup>[16]</sup>,从而 MBL 功能缺失导致 MD 发生。

### 2.3.4 circRNA 与蛋白质相互作用

除了能够结合 microRNA 之外,环形 RNA 还可以与特定的 RNA 结合蛋白 (RBP) 相结合,以调节相应靶标 RNA 的基因表达。一些 circRNAs 已被证明能够与 RBP 相关联来调节转录,以阻止核运输。例如, circ-Foxo3 可以与 FAK 和 HIF-1 $\alpha$  蛋白结合,从而阻止它们的核转位,导致其抗衰老和抗应激的功能降低<sup>[17]</sup>。环状 RNA 能够结合,存储和隔离 RBPs,起到 RBP 海绵的作用。环状 RNA 可以与 HuR, KSRBP, TTP, AUF1 及其他有力调控的 RNA 结合蛋白互动,进而影响各自靶 mRNA 的生物学效应。一些研究发现, circRNAs 还能够通过结合 RBPs 来调节反向剪接以及 circRNA 生物发生<sup>[18-21]</sup>。如由 ILF3 基因产生的 dsRNA 结合蛋白 NF90/NF110,能够直接调节 circRNA 的反向剪接并且还响应于病毒感染<sup>[22]</sup>。在非感染状态下,

NF90/NF110 在细胞核内通过增强内含子互补序列的结合来促进 circRNA 的生物发生,并可作为 circRNPs 输出到细胞质。病毒感染后, NF90/NF110 从 circRNPs 上解离下来,通过与病毒 mRNAs 结合起到抗病毒免疫效应。

### 2.3.5 circRNA 编码蛋白

大多数 circRNAs 是非编码 RNA,但据报道,一些 circRNAs 具有潜在的内部核糖体进入位点(IRES),可将环状 RNA 序列翻译成蛋白质<sup>[23]</sup>。许多这些 circRNAs 使用宿主 mRNA 的起始密码子,并具有进化上保守的终止密码子<sup>[24]</sup>。环状 RNA circ-ZNF609 与线性转录本一样,含有一个开放阅读框(ORF),使得这种环状 RNA 可以翻译成特定的蛋白质以调控成肌细胞增殖<sup>[25]</sup>。然而目前仅有少量的报道称环形 RNA 可以与核糖体相结合,并且这些小肽的功能仍是未知的。后续研究发现 circGprc5a 在膀胱癌中表达上调,它具有编码多肽的潜力<sup>[26]</sup>,并通过肽依赖性方式起作用,促进膀胱肿瘤的发生和转移。circGprc5a 编码的小肽能够与 Gprc5a 基因相结合,通过 circGprc5a-peptide-Gprc5a 网络来靶向膀胱癌发挥作用。

一种常见的 RNA 转录后碱基修饰(N6-甲基腺嘌呤, m6A)也被证明有助于 circRNA 的翻译起始<sup>[27]</sup>。大量研究表明 RNA 甲基化在调节基因表达、维持 RNA 结构稳定性、mRNA 剪接、RNA 编辑、mRNA 降解及翻译起始中起重要作用。大多数 RNA 甲基化酶的识别位点是“RRACH”序列<sup>[28]</sup>,其中各碱基的分布概率如下: [G/A/U][G>A]m6AC[U>A>C]。m6A 修饰被认为是一个动态可逆的过程(图 1-2),这个过程是由一个多蛋白复合体介导产生的,甲基化转移酶(Writers)、去甲基化酶(Erasers)和甲基化阅读蛋白(Readers)等蛋白质都共同参与调控<sup>[29]</sup>。其中甲基化转移酶是一种重要的催化酶,包括 METTL3、METTL14、WTAP 和 KIAA1429 等,其主要作用就是催化 RNA 上腺嘌呤的第 6 位 N 原子发生甲基化修饰。去甲基化酶属于 ALKB 蛋白家族,包括 FTO 和 ALKBH5 等,它的作用是将已发生 m6A 修饰的碱基去甲基化。甲基化阅读蛋白是一种特殊的 RNA 结合蛋白,包括 YTH 和 HNRNP 等蛋白,其功能在于识别并结合已发生 m6A 修饰的碱基,进而激活其下游通路如介导 mRNA 的降解等。

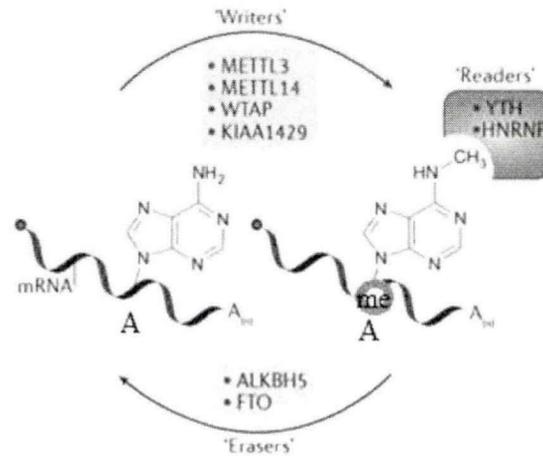


图 1-2 m6A 修饰相关的甲基化转移酶、甲基化阅读蛋白和去甲基化酶

Fig 1-2 The Writers, Readers and Erasers of m6A modification

目前关于 m6A 修饰在非编码 RNA 家族中的调控作用越来越受到关注,如 m6A 能够调控 pri-miRNA 识别<sup>[30]</sup>, m6A 甲基化修饰能够调控 LncRNA FOXM1-AS 促进癌细胞增殖<sup>[31]</sup>。circRNA 的 m6A 修饰可能影响 RNA 的命运及功能,据报道 circRNA 中广泛存在 m6A 修饰且呈现细胞特异性<sup>[32]</sup>。

## 2 家蚕对 BmCPV 的感染应答

中国古代“男耕女织”的经济模式是农业生产的传统生活模式,家蚕在中国已有数千年的饲养历史,苏州蚕业发达,丝绸丰富,“苏绣”更是享誉世界。家蚕质型多角体病毒 (*Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus, BmCPV) 可以通过污染桑经服感染家蚕,从而引起家蚕中肠型脓病,对养蚕业造成很大损害。近年来, BmCPV 苏州株 (BmCPV-SZ) 的全基因组序列分析和克隆工作已经完成,为后续蚕病的防治奠定了基础<sup>[33]</sup>。

### 2.1 家蚕

家蚕 (*Bombyx mori*) 是一种在中国具有重要经济意义的鳞翅目昆虫,可生产丝绸,也是用于研究动物生长发育、分化、免疫调节、遗传和突变的最佳模型之一<sup>[34]</sup>。目前家蚕的基因组测序已全部完成,在过去 10 年间,人们已构建了家蚕精细的基因组序列和遗传变异图谱,而随着生物信息学的迅猛发展,家蚕相关的生物信息及功能基因分析平台也日趋完善<sup>[35]</sup>。大多数研究已从基因水平、蛋白水平探讨了家蚕丝蛋白合成、变态发育、性别决定等的分子机制<sup>[35]</sup>,但对于家蚕非编

码基因的调控机制研究甚少。目前全基因组分析揭示了一些特异性 microRNAs 在蚕丝蛋白合成调节<sup>[36]</sup>及胚胎发生和变态过程中发挥着重要作用<sup>[37]</sup>。据报道家蚕中枢 lncRNAs(Long non-coding RNAs)能够参与蛋白翻译、易位和分泌的过程<sup>[38]</sup>。

## 2.2 家蚕病毒 BmCPV

质型多角体病毒 (CPV) 是呼肠孤病毒科中一类特殊的昆虫病毒病原体, 其多角体蛋白包涵体内含有塔状单层衣壳, 能够侵入细胞并调控内源 RNA 转录<sup>[39]</sup>。感染性 CPV 衣壳包含 10 段双链 RNA (dsRNA) 基因组<sup>[40]</sup>和 6 种结构蛋白<sup>[41]</sup>。在负染色电子显微镜的观察下, CPV 为单壳二十面体, 直径为 600Å, 具有 12 个特征性的塔状突起结构。这些突起大多由 A、B 两个部分组合而成, A 突起不通透, B 突起为中空管状结构<sup>[42]</sup>, CPV 病毒的 mRNA 可通过 A、B 突起之间的缝隙或 B 突起释放出来<sup>[43,44]</sup>。

据报道, 家蚕质型多角体病毒 (*Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus, BmCPV) 的 10 条 dsRNA (S1-S10) 每个都含有一段完整的开放阅读框 (ORF), 其中片段 1, 2, 3, 4, 6 和 7 都编码病毒核心蛋白, 而片段 5, 8 和 9 则编码非结构蛋白, 其最小片段 10 为多角体蛋白基因, 可编码多角体蛋白外壳的主要成分<sup>[45]</sup>。BmCPV 的 S1 片段全长为 4190bp, 含有编码病毒衣壳蛋白 VP1 的 ORF 序列, 分子量约为 148kDa, 其功能主要是参与病毒粒子的装配。而 S7 片段全长为 1501bp, 可编码结构蛋白 VP7 (55kDa 左右), 已有研究表明, VP7 与 BmCPV 病毒的增殖复制密切相关<sup>[46]</sup>。

通过光学显微镜和扫描电子显微镜的观察, 可将 BmCPV 分为 9 个菌株 (I, H, P, A, B, B1, B2, C1 和 C2)<sup>[47,48]</sup>。这些病毒可在家蚕中肠上皮细胞的细胞质中产生大量的蛋白质封闭体, 即多角体<sup>[49,50]</sup>。多角体是病毒编码的蛋白质, 许多病毒粒子被包埋的多角体中<sup>[51,52]</sup>。这些多角体对非离子和离子洗涤剂都具有较高的耐受性, 所以其功能之一是在疾病的水平传播过程中, 保障病毒粒子免于恶劣环境的影响<sup>[48,49]</sup>。多角体的另一个功能是确保将病毒粒子传送至中肠细胞, 其多角体蛋白在胃肠道中会被碱性破坏, 随后病毒衣壳被释放、结合并穿透上皮细胞膜, 将病毒的遗传物质注入宿主细胞的细胞质中, 最终完成病毒的入侵。在病毒复制的过程中, 被感染细胞的细胞质中会产生大量的多角体蛋白并且由于代谢负担, 最终导致细胞死亡<sup>[51]</sup>。家蚕胚胎细胞系 (BmE) 与家蚕卵巢细胞系 (BmN)

是家蚕的两个重要的细胞系。BmCPV 对 BmN 细胞具有较强的感染性（图 1-3）。

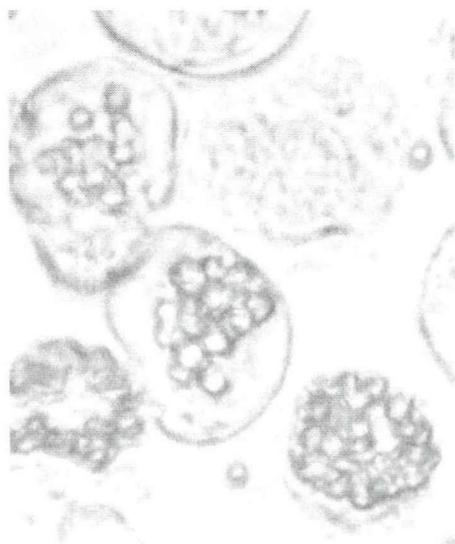


图 1-3 感染 BmN 细胞 7 天后 BmCPV 多角体的光学显微照片

Fig 1-3 Light micrographs of BmCPV polyhedra infected BmN cells for 7 days

BmCPV 发病周期长，一般潜伏 1-2 个龄期。受感染家蚕的特征是体色灰黄，胸部半透明呈“空头状”，发育不齐，食欲减退，呆伏四周。一些病毒会随着粪便排出体外，继而感染其他健康家蚕。随着感染的进行，家蚕中肠由青绿变为白色，且在中肠后部可以观察到乳白色横向皱纹，这是 BmCPV 发病的典型症状<sup>[52]</sup>。

### 2.3 家蚕对 BmCPV 的感染应答

家蚕质型多角体病毒（BmCPV）是家蚕主要的病原体之一，对蚕桑生产造成了严重地破坏。到目前为止，除综合预防外，尚未有对 BmCPV 引起的疾病进行有效治疗的方法，因此许多研究从转录组水平阐明了家蚕对 BmCPV 感染的免疫应答及宿主与 BmCPV 之间的互作机制，为 BmCPV 感染疾病的防治奠定理论基础。

对感染 BmCPV 的 4008 家蚕品系的中肠组织进行数字基因表达分析，从对照及 BmCPV 感染的家蚕幼虫中共检测到 752 个差异表达基因，其中 649 个基因表达上调，103 个基因表达下调。GO 和 KEGG 分析结果显示，其中 334 个基因参与核糖体和 RNA 转运途径，并在表达谱中检测到差异表达的基因参与信号传导、基因表达、代谢过程、细胞死亡、结合和催化活性变化。研究表明钙调蛋白，FK506 结合蛋白和蛋白激酶 c 抑制基因表达水平的上调可能导致了 BmCPV 感染细胞中钙依赖性的细胞凋亡，以保护宿主免受 BmCPV 的侵害<sup>[53]</sup>。另外通过微阵列系统比

较正常家蚕及 BmCPV 感染 24、48、72h 后家蚕幼虫中肠组织中的差异表达基因, 分别获得了 258 和 951 个差异表达基因。KEGG 通路分析表明, 参与代谢途径的大多数基因表达下调, 而各种免疫相关基因 (包括脂肪酶, 热休克蛋白, 细胞色素 P450 和核糖体 P0 蛋白) 的表达均上调, 可见鉴定的差异表达基因可能对 BmCPV 感染有反应<sup>[54]</sup>。越来越多的证据表明, miRNA 可以通过调节宿主抗性基因或病毒基因的表达来破坏病毒复制, 并在调节宿主与病原体的相互作用中起关键作用。将 BmCPV 感染后家蚕和正常家蚕进行高通量测序, 对差异表达 miRNA 的预测靶基因通过生物信息学进一步分析发现 miRNA 靶标参与家蚕的天然免疫过程。如 bmo-miR-14 在接种病毒 72h 后的中肠组织中表达下调, 已有实验证明 miR-14 具有抑制细胞凋亡的作用, 而细胞凋亡能够通过脱落受感染的细胞在抗病毒防御机制中发挥作用, 所以 bmo-miR-14 可能在家蚕与 BmCPV 的相互作用中起作用<sup>[55]</sup>。

这些研究结果从 mRNA、miRNA 水平揭示了家蚕抗 BmCPV 感染的分子机制, 但是目前关于 BmCPV 感染后家蚕 circRNAs 的免疫应答机制还没有涉及, 家蚕 circRNAs 的功能研究可能对家蚕疾病的治疗具有潜在意义。

### 3 研究目的与研究内容

#### 3.1 研究目的和意义

家蚕是鳞翅目昆虫的典型代表, 具有重要的农业和经济意义。家蚕的繁殖成本低, 生长时间短, 遗传背景清晰, 并且拥有大量与人类同源的基因, 因此在生命科学研究方面具有诸多应用潜力。蚕病一直以来危害蚕桑业, 对我国国民经济造成了严重损伤, 家蚕质型多角体病毒 (BmCPV) 又是主要的家蚕病毒之一。BmCPV 是一种无包膜的 dsRNA 病毒, 其能特异地感染家蚕的中肠上皮细胞, 引发家蚕中肠型脓病, 最终导致养蚕业歉收。

环状 RNA (circRNA) 是一种不含 5' 末端帽子和 3' 末端 poly(A) 尾巴, 并以共价键形成封闭环形结构的非编码 RNA 分子, 是近年来 RNA 领域最新的研究热点。目前已在多种生命体中发现了 circRNAs 的广泛分布, 并且 circRNAs 具有很多重要的生物学功能, 例如它能够充当 miRNA 海绵以调控靶基因表达, 能够参与调控转录过程, 能够与自身 mRNA 的经典剪接相竞争, 能够与蛋白质互作, 能够编码小肽, 且可作为一种癌症的潜在标记物。

目前已有研究表明, BmCPV 感染家蚕中肠后, 家蚕的 mRNAs、miRNAs 和蛋白质的表达模式都发生了变化, 这些研究为了解家蚕对 BmCPV 的感染反应、宿主与 BmCPV 之间的互作提供了新的线索。circRNA 在调节真核生物的基因表达、调控生长发育和病理进程中起着重要作用, 但是关于 BmCPV 感染后, 家蚕中肠 circRNAs 表达模式的变化及家蚕 circRNA 的功能仍无相关报道。

因此在本研究中, 我们对 BmCPV 感染中肠和健康的家蚕中肠进行 circRNAs 高通量测序, 分析 BmCPV 感染后 circRNA 表达模式的变化, 对差异表达 circRNA 的亲本基因进行功能注释, 利用生物信息学的方法构建 circRNA-miRNA-mRNA 调节网络, 进一步对调节网络中的基因进行功能分析; 在此基础上, 选择差异表达的 circRNA\_5655, 从其表达模式、与 miRNA 和蛋白互作、编码蛋白的潜在性及其作用等方面研究其功能及作用机制。相关研究结果不仅可以从全基因组水平明确 circRNA 表达对 BmCPV 的感染应答, 也可为理解 BmCPV 与宿主互作机制提供新的线索, 为 BmCPV 感染疾病的防治提供潜在的分子靶标。

## 3.2 研究内容

### 3.2.1 BmCPV 的感染对家蚕 circRNAs 表达模式的影响

- (1) 家蚕中肠 circRNAs 的特性
- (2) 差异表达 circRNAs 的筛选
- (3) 差异表达前 20 的 circRNAs 亲本基因的 GO 和 KEGG 通路富集分析
- (4) circRNA-miRNA 互作网络的构建
- (5) 家蚕 circRNAs 的验证

### 3.2.2 家蚕 circRNA\_5655 的功能及作用机制

- (1) circRNA\_5655 的一般特征
- (2) circRNA\_5655 的表达模式及对 BmCPV 的感染应答
- (3) 体外转录法构建 circRNAs 及 circRNA\_5655 表达载体的构建
- (4) circRNA\_5655 对其亲本基因表达的影响
- (5) circRNA\_5655 在 BmN 细胞中的定位及与蛋白 NF90 的共定位
- (6) circRNA\_5655 竞争结合 miRNA 对靶基因的调节作用
- (7) circRNA\_5655 对细胞免疫、凋亡相关基因表达的影响
- (8) circRNA\_5655 对 BmCPV 增殖复制的影响

(9) circRNA\_5655 与蛋白的相互作用

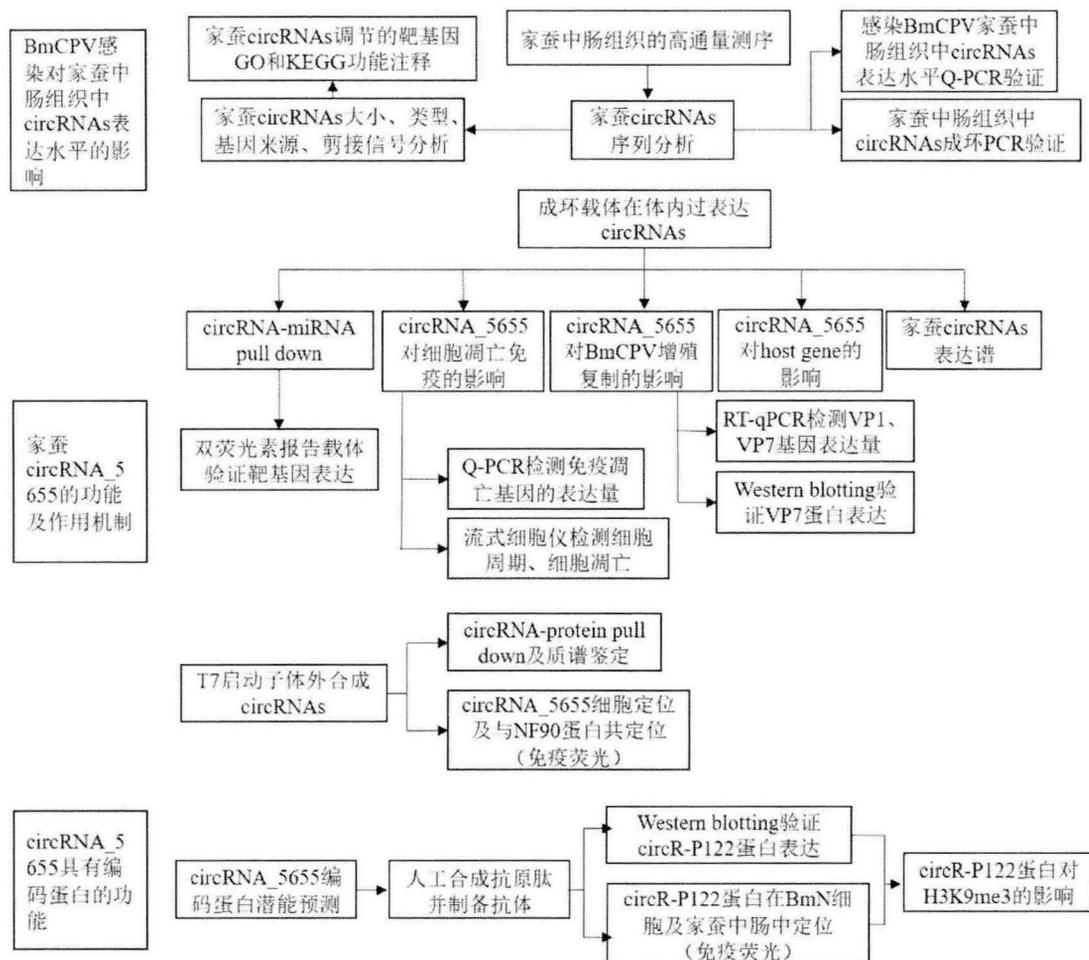
3.2.3 circRNA\_5655 具编码蛋白的功能

(1) circRNA\_5655 编码蛋白的潜在性预测及 Western blotting 验证

(2) circRNA\_5655 编码蛋白在 BmN 细胞及家蚕中肠中的免疫荧光定位

(3) pIZT-ORF1 载体构建及 circRNA\_5655 编码蛋白对 H3K9me3 的影响

3.3 技术路线



参考文献

[1] Suzuki H, Zuo Y, Wang J, et al. Characterization of RNase R-digested cellular RNA source that consists of lariat and circular RNAs from pre-mRNA splicing[J].Nucleic Acids Res, 2006, 34(8): e63.

[2] Vincent H A, Deutscher M P. Substrate recognition and catalysis by the exoribonuclease RNase R[J].J Biol Chem, 2006, 281(40):29769–29775.

- [3] Hsu M T, Coca-Prados M. Electron microscopic evidence for the circular form of RNA in the cytoplasm of eukaryotic cells[J]. *Nature*, 1979, 280:339–340.
- [4] Daniëlle V R , Verheijen B M , Jeroen P R . Circular RNAs: Novel Regulators of Neuronal Development[J]. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2016, 9.
- [5] Jeck W R, Sorrentino J A, Wang K, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats[J]. *RNA*, 2013, 19(2):141–157.
- [6] Meng X, Li X, Zhang P, et al. Circular RNA: an emerging key player in RNA world[J]. *Brief Bioinform*, 2017, 18(4):547–557.
- [7] Talhouarne G J S, Gall J G. Lariat intronic RNAs in the cytoplasm of vertebrate cells[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2018, 115(34):E7970–E7977.
- [8] Sun W , Yang X , Li X , et al. Circular RNA: A new star of noncoding RNAs[J]. *Cancer Letters*, 2015, 365(2):141-148.
- [9] Zhang Y, Zhang X O, Chen T, et al. Circular intronic long noncoding RNAs[J]. *Mol Cell*, 2013, 51(6):792–806.
- [10] Jeck W R, Sharpless N E. Detecting and characterizing circular RNAs[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(5):453–461.
- [11] Yang Z , Wu J . MicroRNAs and Regenerative Medicine[J]. *DNA and Cell Biology*, 2007, 26(4):257-264.
- [12] Peng L, Yuan XQ, Li GC. The emerging landscape of circular RNA ciRS-7 in cancer (Review) [J]. *Oncol Reports*, 2015, 33:2669–74.
- [13] Hsiao K Y, Lin Y C, Gupta S K, et al. Noncoding Effects of Circular RNA CCDC66 Promote Colon Cancer Growth and Metastasis[J]. *Cancer Research*, 2017, 77(9):2339.
- [14] Han D, Li J, Wang H, et al. Circular RNA circMTO1 acts as the sponge of microRNA-9 to suppress hepatocellular carcinoma progression[J]. *Hepatology*, 2017, 66(4):1151.
- [15] Li Z, Huang C, Bao C, et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2015, 22(3):256–264.
- [16] Ashwal-Fluss R, Meyer M, Pamudurti N, et al. circRNA Biogenesis Competes with Pre-mRNA Splicing[J]. *Molecular Cell*, 2014, 56(1):55-66.
- [17] Du W W, Yang W, Chen Y, et al. Foxo3 circular RNA promotes cardiac senescence by modulating multiple factors associated with stress and senescence responses[J]. *European Heart Journal*, 2016:ehw001.

- [18] Conn S , Pillman K , Toubia J , et al. The RNA Binding Protein Quaking Regulates Formation of circRNAs[J]. *Cell*, 2015, 160(6):1125-1134.
- [19] Ivanov A , Memczak S , Wyler E , et al. Analysis of Intron Sequences Reveals Hallmarks of Circular RNA Biogenesis in Animals[J]. *Cell Reports*, 2015, 10(2):170-177.
- [20] Kramer M C , Liang D , Tatomer D C , et al. Combinatorial control of *Drosophila* circular RNA expression by intronic repeats, hnRNPs, and SR proteins[J]. *Genes & development*, 2015, 29(20):2168.
- [21] Rybak-Wolf A , Stottmeister C , Glažar P , et al. Circular RNAs in the Mammalian Brain Are Highly Abundant, Conserved, and Dynamically Expressed[J]. *Molecular Cell*, 2015, 58(5):870-885.
- [22] Li X , Liu C X , Xue W , et al. Coordinated circRNA Biogenesis and Function with NF90/NF110 in Viral Infection[J]. *Molecular Cell*, 2017:S1097276517303635.
- [23] Chen C Y , Sarnow P . Initiation of protein synthesis by the eukaryotic translational apparatus on circular RNAs[J]. *Science*, 1995, 268(5209):415-417.
- [24] Pamudurti N R , Bartok O , Jens M , et al. Translation of CircRNAs[J]. *Molecular Cell*, 2017, 66(1):9-21.e7.
- [25] Legnini I , Di Timoteo G , Rossi F , et al. Circ-ZNF609 Is a Circular RNA that Can Be Translated and Functions in Myogenesis[J]. *Molecular Cell*, 2017, 66(1):22-37.e9.
- [26] Gu C H , Zhou N C , Wang Z Y , et al. circGprc5a Promoted Bladder Oncogenesis and Metastasis through Gprc5a-Targeting Peptide [J]. *Nucleic Acids Mol*, 2018, 13:633-641.
- [27] Yang Y , Fan X , Mao M , et al. Extensive translation of circular RNAs driven by N6-methyladenosine[J]. *Cell Research*, 2017, 27(5): 626.
- [28] Roundtree I A , Evans M E , Pan T , et al. Dynamic RNA Modifications in Gene Expression Regulation[J]. *Cell*, 2017, 169(7):1187-1200.
- [29] Deng X , Su R , Weng H , et al. RNA N6-methyladenosine modification in cancers: current status and perspectives[J]. *Cell Research*, 2018, 28(5):507-517.
- [30] Claudio R. Alarcón, Lee H , Goodarzi H , et al. N6-methyl-adenosine (m6A) marks primary microRNAs for processing[J]. *Nature*, 2015, 519(7544):482.
- [31] Zhang S , Zhao B S , Zhou A , et al. m6A Demethylase ALKBH5 Maintains Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells by Sustaining FOXM1 Expression

- and Cell Proliferation Program[J]. *Cancer Cell*, 2017, 31(4):591-606.e6.
- [32] Zhou C, Molinie B, Xing Y, et al. Genome-Wide Maps of m6A circRNAs Identify Widespread and Cell-Type-Specific Methylation Patterns that Are Distinct from mRNAs[J]. *Cell Reports*, 2017, 20(9):2262-2276.
- [33] 孟祥坤. BmCPV-SZ 全基因组序列测定与分析及其多角体蛋白包装特性的研究[D]. 苏州大学, 2010.
- [34] Jian Q. Advances in Silkworm Modeling Research[J]. *Science of Sericulture*, 2010, 36(4):645-649.
- [35] Xia Q, Li S, Feng Q. Advances in Silkworm Studies Accelerated by the Genome Sequencing of *Bombyx mori*[J]. *Annual Review of Entomology*, 2014, 59(1):513-536.
- [36] Liu S, Li D, Li Q, et al. MicroRNAs of *Bombyx mori* identified by Solexa sequencing[J]. *Bmc Genomics*, 2010, 11(1):148.
- [37] Zhang Y, Zhou X, Ge X, et al. Insect-Specific microRNA Involved in the Development of the Silkworm *Bombyx mori*[J]. *PLOS ONE*, 2009, 4(3):e4677.
- [38] Yuqian W, Tingcai C, Chun L, et al. Systematic Identification and Characterization of Long Non-Coding RNAs in the Silkworm, *Bombyx mori*[J]. *PLOS ONE*, 2016, 11(1):e0147147.
- [39] Yu X, Jin L, Zhou Z H. 3.88 A structure of cytoplasmic polyhedrosis virus by cryo-electron microscopy[J]. *Nature*, 2008, 453(7193):415-419.
- [40] Hayashi Y, Kawase S. Base pairing in ribonucleic acid extracted from the cytoplasmic polyhedra of the silkworm[J]. *Virology*, 1964, 23(4):611-614.
- [41] Payne C C, Rivers C F. A Provisional Classification of Cytoplasmic Polyhedrosis Viruses Based on the Sizes of the RNA Genome Segments[J]. *Journal of General Virology*, 1976, 33(1):71-85.
- [42] 余学奎, 卢英, 张红, 等. 家蚕质多角体病毒(BmCPV)结构研究[J]. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 1999, 31(5):563-566.
- [43] Yazaki K, Miura KI. Relation of the structure of cytoplasmic polyhedrosis virus and the synthesis of its messenger RNA[J]. *Virology*, 1980, 105(2):467-479.
- [44] Zhang H, Zhang J, Yu X, et al. Visualization of protein-RNA interactions in cytoplasmic polyhedrosis virus[J]. *J Virol*, 1999, 73(2):1624-1629.
- [45] McCrae M A, Mertens P P C. In vitro translation studies on and RNA coding

- assignments for cytoplasmic polyhedrosis viruses[J]. Elsevier Science, 1983, 35-41.
- [46] 何蕾. 家蚕质型多角体病毒(BmCPV)基因组片段 7(S7)功能的研究[D]. 苏州大学, 2014.
- [47] Hukuhara T, Midorikawa M. Pathogenesis of cytoplasmic polyhedrosis in the silkworm[J]. Elsevier Science, 1983, 405-414.
- [48] Belloncik S . Cytoplasmic polyhedrosis viruses-Reoviridae.[J]. Advances in Virus Research, 1989, 37(1):173-209.
- [49] Miller L K, Ball L A. The Insect Viruses[M]. 1998.
- [50] Payne C C, Mertens P P C. Cytoplasmic Polyhedrosis Viruses[M]. The Reoviridae, 1983, 425-504.
- [51] Zhang H , Zhang J , Yu X , et al. Visualization of protein-RNA interactions in cytoplasmic polyhedrosis virus.[J]. Journal of Virology, 1999, 73(2):1624-9.
- [52] Magnoler A . Effects of a cytoplasmic polyhedrosis on larval and postlarval stages of the gypsy moth, *Porthetria dispar*[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1974, 23(3):263-274.
- [53] Gao K, Deng X Y, Qian H Y, et al. Digital Gene Expression analysis in the midgut of 4008 silkworm strain infected with cytoplasmic polyhedrosis virus[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2014, 115:8-13.
- [54] Wu P, Liu T, Qin G, et al. Analysis of Responsive Genes in the Midgut of Silkworm Infected with *Bombyx mori* Cytoplasmic Polyhedrosis Virus[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2011, 39(1):167-181.
- [55] 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.

## 第二章 BmCPV 感染对家蚕中肠组织中 circRNAs 表达模式的影响

**摘要:** 目前家蚕质型多角体病毒(BmCPV)感染发病的机制尚不明确, 已有越来越多的证据表明, 作为竞争性内源 RNAs 或正向调节因子的环状 RNA(circRNA)在调节真核生物的基因表达中起着重要作用, 因此推断其可能在 BmCPV 感染过程中发挥作用。为探讨 BmCPV 感染后家蚕中肠中 circRNA 的表达及生物学功能, 采用高通测序法测定了正常中肠组织(对照)和 BmCPV 感染的中肠组织(试验)中家蚕 circRNAs 的表达谱。从对照和试验样品中分别检测到了 9753 和 7475 个 circRNAs, 其中共表达的 circRNAs 有 6085 个, 在对照和试验样品中分别有 646 和 737 个 circRNAs 特异性表达。共检测到差异表达 circRNAs 3638 个, 其中 400 个 circRNAs 差异表达倍数变化  $\geq 2.0$  ( $p < 0.05$ ,  $FDR < 0.05$ ), 病毒感染后 294 个上调, 106 个下调。通过 GO 和 KEGG 富集分析大体上注释了差异表达 circRNAs 亲本基因的主要功能。基于差异表达的 circRNAs 与 microRNA(miRNA)结合位点之间的相关性分析, 构建 circRNA-miRNA 相互作用网络, 推断出 13 个 miRNAs 与 193 个 circRNAs 间的相互作用。bmo-miR-3389-5p, bmo-miR-745-3p 和 bmo-miR-3262 分别与 30, 34 和 34 个 circRNAs 互作。circRNA\_8115, circRNA\_9444, circRNA\_4553, circRNA\_0827 和 circRNA\_6649 分别含有 6、5、4、4 和 4 个 miRNA 结合位点。同时还发现 circRNAs 选择性环化是家蚕的普遍特征, 许多家蚕 circRNAs 的 junction 位点侧序列符合典型的 GT/AG 剪接信号。我们的研究首次显示了 circRNA 对病毒感染的反应。因此本研究为 BmCPV 发病进程中 circRNA-miRNA 互作提供了新的视角, 为今后研究 circRNAs 在 BmCPV 发病机制中的潜在作用奠定了基础。

**关键词:** 家蚕; circRNA; 高通量测序; BmCPV; miRNA

### 1 引言

环状 RNA(circRNA)是共价形成的闭环结构, 不具有 5' 到 3' 端极性, 也不含有 poly(A)尾巴, 它们被认为是一类新的非编码 RNA, 重塑了我们对于 RNA 生物学的

理解<sup>[1]</sup>。因为它们特殊的结构,相比于线性RNA, circRNAs在体内高度稳定<sup>[2]</sup>。circRNAs的共价闭环结构不仅有利于保护其免受核酸外切酶的降解,而且还有益于其作反义RNA,适体,核酶或小干扰RNA的应用<sup>[3-6]</sup>。CircRNAs存在于所有生命中,并且已经从病毒<sup>[7]</sup>,植物<sup>[8]</sup>,古细菌<sup>[9]</sup>和动物<sup>[2,10-12]</sup>中得到鉴定。

由于其丰富性和稳定性, circRNAs比非环状RNA更具微小RNA(miRNAs)海绵吸附作用<sup>[13]</sup>。miRNAs对于调节蛋白质表达和细胞生理具有重要作用,因此 circRNAs可能在调节细胞生理过程如细胞增殖和分化中发挥作用<sup>[14]</sup>。据报道, circRNAs可作为miRNA海绵起作用,能够自然隔离和竞争性抑制miRNA活性以调节靶基因表达<sup>[13]</sup>。已有报道表明,环状RNA CiRS-7含有miR-7的多个结合位点,这使得它能够吸附这种miRNA<sup>[15]</sup>。一种称为性别决定簇Y的circRNA包含许多miRNA结合位点,具有miR-138海绵作用<sup>[16]</sup>。CircHIPK3含有9个miRNA的18个潜在结合位点,可直接结合并抑制miR-124,一种众所周知的肿瘤抑制因子<sup>[2]</sup>。软骨细胞外基质相关的circRNA通过吸附miR-136海绵,来调节基质金属蛋白酶13的表达,且参与软骨细胞外基质降解<sup>[17]</sup>。

除了结合miRNAs之外, circRNAs还调节线性RNA的可变剪接和转录。例如由剪接因子MBL的第二外显子产生的circRNA Mbl,其与经典的前体mRNA剪接竞争,调节亲本基因的表达<sup>[18]</sup>。最近的研究报道表明,多种circRNAs可以在体外或体内翻译成蛋白质,因为它们起始密码子上游具有内部核糖体进入位点<sup>[19]</sup>。据报道, circRNAs也可以修饰结合因子细胞定位及功能<sup>[20]</sup>。此外,有证据表明稳定的circRNAs可以被逆转录并整合到基因组中,从而形成RNA衍生的假基因<sup>[21]</sup>。

许多研究表明circRNA丰度,定位,功能和结构可以改变,以响应细胞中的各种刺激或病理状况。暴露于这些条件可能会改变circRNA与DNA, RNA或蛋白质的相互作用,这可能会影响核糖核蛋白复合物的成分<sup>[20]</sup>。

许多研究小组已从 miRNA, mRNA 以及蛋白质表达谱的变化探讨了家蚕质型多角体病毒(BmCPV)感染的发病机制。BmCPV 感染中肠后, 58 种 miRNAs 的表达呈现显著差异<sup>[22]</sup>。下一代测序结果显示, BmCPV 感染后, 167 个基因表达上调, 141 个基因表达下调。有一些基因可能参与家蚕对 BmCPV 的免疫反应<sup>[23]</sup>。通过数字基因表达分析, 在感染 BmCPV 的 4008 家蚕品种的中肠中共检测到 752 个差异表达基因, 其中 649 个上调, 103 个下调。表达谱分析显示, 大多数差异表达的基

因参与信号传导、基因表达、代谢过程、细胞死亡、结合和催化活性的变化<sup>[24]</sup>, 一些重要的差异表达基因参与信号转导、酶活性和细胞凋亡的变化<sup>[25]</sup>。通过 iTRAQ 蛋白质组学研究了 BmCPV 感染后家蚕中肠中的蛋白质表达模式, 结果显示 11 种差异表达的蛋白质与免疫应答有关<sup>[26]</sup>。然而, 有关 BmCPV 感染后家蚕 circRNAs 表达水平仍不清楚。在本研究中, 我们对 BmCPV 感染后家蚕中肠中的 circRNAs 进行了全面分析, 以阐明病毒感染后家蚕基因组编码的 circRNAs 的潜在功能。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 载体、菌种与生物材料

载体: pMD19-T 载体为 Invitrogen 公司产品, 载体图谱详见附录一。

菌种: Trans5 $\alpha$  购自北京全式金生物公司(TransGen Biotech)

生物材料:

大造品种家蚕由本实验室保存; 家蚕质型多角体病毒(BmCPV)由苏州大学基础医学与生物科学学院分子生物学研究室保存。

#### 2.1.2 工具酶及试剂盒

RNAiso Plus 试剂为大连宝生物有限公司(TaKaRa)产品。DNA 标准分子量 Marker、反转录试剂盒、SYBR Green 试剂盒均购于北京全式金生物公司(TransGen Biotech)。Ribonuclease R 为 Epicentre 公司产品。DNA Taq 聚合酶购于 Fermentas 公司。DNA 胶回收试剂盒购于 Axygen 公司。DNaseI、T4 DNA 连接酶均为赛默飞世尔科技有限公司(Thermo fisher)产品。

#### 2.1.3 其他试剂

胰蛋白胨、琼脂糖、氨苄青霉素购于上海生工生物工程有限公司。酵母提取物、平衡酚购于 Solarblo 公司。琼脂粉购于 Biosharp 公司。GelRed 购于 Biotium 公司。其余试剂均为国产分析纯。

#### 2.1.4 常用仪器见附录二

### 2.2 试剂配制

#### 2.2.1 LB 液体培养基

胰蛋白胨	10g
NaCl	10g
酵母提取物	5g

用去离子水溶解粉末，并定容至 1 L，3ml 每试管分装，121℃ 高压湿热灭菌 30 min，存于室温。

### 2.2.2 LB 固体培养基

胰蛋白胨	10g
NaCl	10g
酵母提取物	5g
琼脂粉	15g

用去离子水溶解粉末，并定容至 1 L，121℃ 高压湿热灭菌 30 min，冷却至约 50℃ 再加入 1/1000 体积的抗生素，铺制平板，存于 4℃。当铺制 Zeocin 抗性的平板时，使用低盐培养基，即加入的 NaCl 量减半。

### 2.2.3 氨苄(ampicillin, Amp)抗生素

氨苄青霉素	0.1g
-------	------

粉末溶于 1 mL 去离子水，存于 4℃。

### 2.2.4 75 mmol/L CaCl<sub>2</sub>

称量 8.25 g 无水 CaCl<sub>2</sub> 溶于去离子水，并定容至 1 000 mL，高压湿热灭菌，存于 4℃。

### 2.2.5 5×TBE 缓冲液贮存液

Tris 碱	54g
硼酸	27.5g
0.5 mol/LEDTA	20ml

将粉末溶于去离子水，并定容至 1 L，调 pH 至 8.0，工作液用去离子水稀释至 0.5×，存于室温。

### 2.2.6 1%琼脂糖(Agarose)

琼脂糖	1g
0.5×TBE 缓冲液	100mL

加热使粉末充分混匀溶解，冷却至 50℃ 左右，添加 5 μL GelRed，混匀后灌制凝胶。

## 2.3 实验方法

### 2.3.1 BmCPV 病毒接种家蚕<sup>[27]</sup>

实验组：将 BmCPV 多角体原液用蒸馏水稀释至浓度约为  $10^6$  个多角体/mL，均匀涂布于新鲜擦净的桑叶上，晾干后添食 3 龄 1 天的家蚕 8 小时，于 26℃、70%-85%湿度环境下饲养。病毒接种后，于 6、12、24、48 及 72 小时分别剖取 30 头家蚕的中肠，于 -80℃ 保存备用。

对照组：将涂布无菌水的新鲜擦净的桑叶，添食 3 龄 1 天的家蚕，其余步骤同上。

### 2.3.2 测序样品送样

测序样品送于上海欧易生物医学科技有限公司进行 circRNAs 高通量测序。

### 2.3.3 circRNAs 高通量测序流程

(1) RNA 提取：分别将上述对照组及实验组 6、12、24、48、72h 的所有中肠混合，并使用 RNAiso Plus 试剂提取总 RNA。用 DNaseI 处理总 RNA 样品，以消除 DNA 污染。

(2) RNase R 消化：取 20μg 总 RNA 于 70℃ 温育 5min，再加入 3μL RNase R 于 37℃ 孵育 10min，尔后用酚/氯仿抽提。

(3) Ribo-Zero 去除 rRNA：取上述 RNase R 消化的 1μg RNA，使用 Ribo-Zero Gold 试剂盒 (Illumina 公司) 去除 rRNAs，然后使用 Ambion RNA 片段化试剂盒 (Thermo Fisher 公司) 将 RNA 片段化。

(4) 第一和第二链 cDNA 的合成：将 8μL 的第一链合成预混液和 SuperScript II 逆转录酶添加到去除了 rRNA 的 RNA 中，并在 25℃ 下孵育 10min，42℃ 孵育 15min，再 70℃ 孵育 15min。然后，将 5μL 的末端修复混合液与 20μL 第二链预混液混合，并在 16℃ 下孵育 60min。

(5) 3' 末端的腺苷酸化和测序接头(Adapter)的连接：加入 12.5μL A 加尾混合液，于 37℃ 下孵育 30min，再 70℃ 孵育 5min。然后加入 2.5μL 连接混合液和 2.5μL RNA Adapter Index，在 30℃ 下孵育 10min，最后加入 5μL 连接终止缓冲液以阻止反应。

(6) RNA 测序文库制备和 Illumina 测序：将上述构建好的文库用 Agilent 2100 Bioanalyzer 质检合格后，使用 Illumina HiSeq™ 2500 测序仪进行 circRNA 测序。

使用 Bowtie2 软件(<http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/manual.shtml>)将 clean reads 与参考基因组进行比对。对于 unmapped reads, 使用反向剪接(back-splice)算法挑选出位点。最后使用由上海欧易生物医学科技有限公司开发的软件验证 circRNA, 并以此作为参考序列进行后续分析。circRNA 的表达水平通过 RPM(Mapped back-splicing junction reads per million mapped reads)进行测量。

#### 2.3.4 生物信息学分析

将所鉴定的差异表达 circRNA 的亲本基因进行 GO(Gene Ontology)功能注释和 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)Pathway 分析。GO 分析(<http://www.geneontology.org>)用于构建多种生物基因及基因产物的注释, 其涉及生物过程(Biological process, BP), 细胞组成(Cellular component, CC)和分子功能(Molecular function, MF)领域。 $-\log_{10}$  值(p 值)表示富集分数, 代表差异表达基因中 GO 富集的显著性。我们还对差异表达基因进行了 KEGG 通路分析, 其涵盖了分子间相互作用及其网络。另外,  $-\log_{10}$  值(p 值)表示富集分数, 显示 Pathway 相关性分析的显著性。使用 miRanda 软件预测 miRNA 靶标, 并从 miRBase 下载 miRNA 序列。对于 miRNA 靶基因预测, 我们从 NCBI 的 UniGene 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=unigene>)提取家蚕所有的 3'非翻译区(3'-UTR), 并利用 PITA 程序验证 miRNAs 及其靶标相互作用的可能性。根据最初的预测, 我们挑选并分析了 Gibbs 标准自由能为 25 kcal/mol 的靶基因。我们根据 circRNAs 的共同靶 miRNA 构建了 miRNA-circRNA 网络。使用基于 TargetScan 和 miRanda 的 Arraystar miRNA 靶标预测软件预测 circRNAs、miRNA 和 mRNAs 之间的相互作用<sup>[28,29]</sup>。

#### 2.3.5 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)

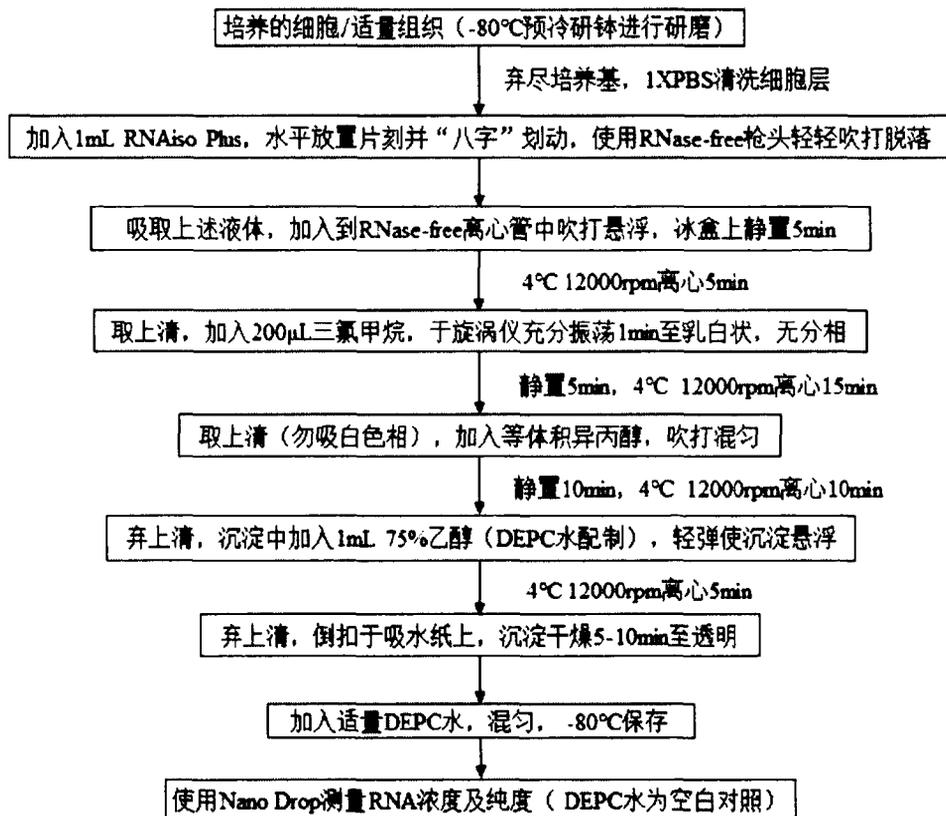
用 2 $\mu$ g 或 4 $\mu$ g RNA 为模板量, 按照上述 RNA 反转录步骤, 得到 cDNA, 以 cDNA 为模板, 进行 RT-qPCR。反应体系如下:

2 $\times$ TransStart Tip Green qPCR SuperMix	10 $\mu$ L
Primer 1+2 (1 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
cDNA Template	2 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	7 $\mu$ L

各组份混匀, 3500rpm 离心 5min。PCR 程序设置如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3min, 95 $^{\circ}$ C

变性 10s, 60°C 1 min, 反应进行 40 个循环并添加熔解曲线。每个样品设置 3 组重复, 选择某一基因为内参, 其他基因的相对表达量用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  计算, 差异显著性使用 SPSS 软件计算。

### 2.3.6 Total RNA 的提取



### 2.3.7 RNA 反转录步骤

RNA模板	2μL	}	置于冰盒混匀 65°C 5min 0°C 2min
Random Primer	1μL		
RNase-free Water	5μL		
再次		}	置于冰盒混匀 25°C 10min
Reaction Mix	10μL		
Enzyme Mix	1μL		
gDNA Remover	1μL		

混匀, 若产物用于 PCR, 则 42°C 金属浴反应 30min; 若产物用于定量 PCR, 则 42°C 金属浴反应 15min, 最后 85°C 反应 5s。

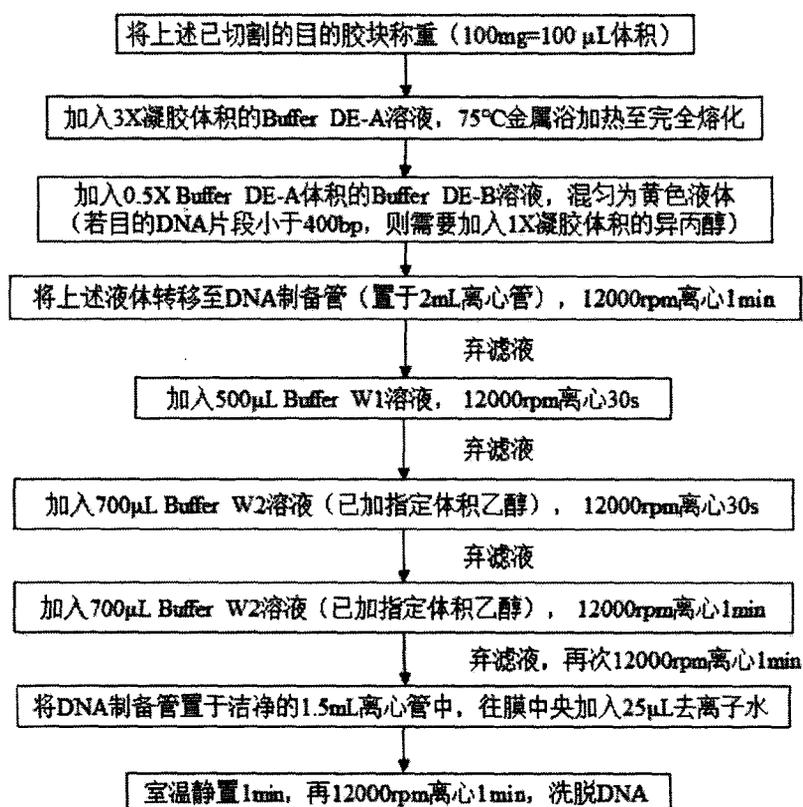
### 2.3.8 聚合酶链式反应 (25μL 反应体系)

10×PCR buffer (Mg <sup>2+</sup> free)	2.5μL
Mg <sup>2+</sup> (25mM)	1.5μL
dNTP (2.5mM)	2μL
模板 (DNA、cDNA 和质粒等)	1μL
Primer 1+2 (1μM)	1μL
Taq DNA 聚合酶 (1U/μL)	1μL
ddH <sub>2</sub> O	16μL

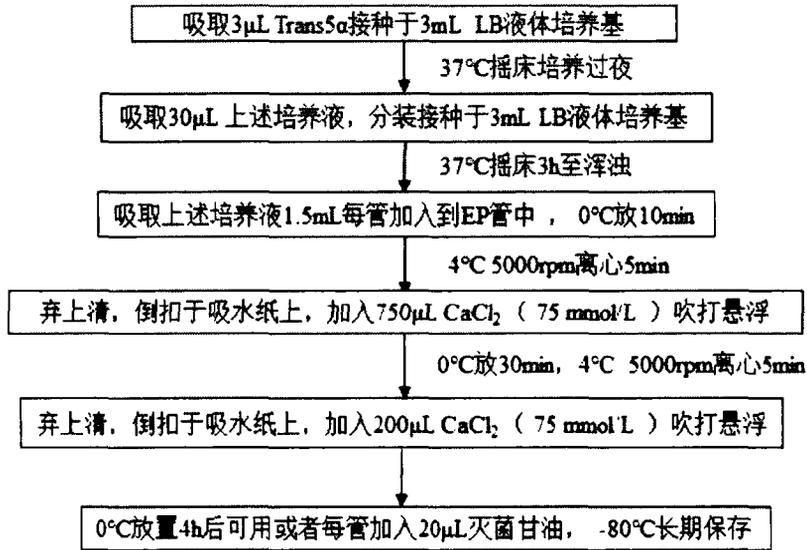
将上述液体于混旋仪混匀，使用 PCR 仪进行实验，程序设定如下：94℃ 预变性 5min，94℃ 变性 30s，55℃（可设置退火温度梯度）复性 30s，72℃ 延伸 50s（由片段大小决定），30 个循环后，72℃ 延伸 10min，存于 4℃。

### 2.3.9 琼脂糖凝胶电泳及 DNA 胶回收

将 5×TBE 缓冲液贮存液配制成 0.5×TBE 工作液，加入电泳槽至浸没 1% 琼脂糖凝胶的胶板，将 PCR 产物加入 3μL 10X loading buffer 加样，再加入 3μL DNA Marker 点样，50-100V 电泳至溴酚蓝跑于胶中间位置，于紫外凝胶成像仪下观察，紫外下切割目的胶条。



## 2.3.10 感受态细胞的制备



## 2.3.11 连接转化

DNA 连接反应体系 (25 $\mu$ L):

目的片段 (胶回收或酶切产物)	12 $\mu$ L
pMD19-T 载体	0.5 $\mu$ L
10 $\times$ T4 ligase buffer	2.5 $\mu$ L
T4 DNA ligase (350U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	9 $\mu$ L

瞬离混匀上述液体, 于 16 $^{\circ}$ C 金属浴中连接过夜。

将上述 DNA 连接产物添加至感受态细胞悬液, 吹打混匀, 0 $^{\circ}$ C 放置 30min, 42 $^{\circ}$ C 热激 90s, 再 0 $^{\circ}$ C 放置 5min。每管加入 1mL LB 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C 摇床培养 1h, 5000rpm 离心 5min 收集菌液, 留下 200 $\mu$ L 培养液吹打混匀。使用涂布棒将菌液均匀涂布于含 Amp 的 LB 固体培养基上, 37 $^{\circ}$ C 培养箱先正放 30min, 再倒置过夜。挑取单个菌落至 3mL 含 Amp 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 摇床培养 8h, 经菌液 PCR 再次鉴定, 送苏州泓迅生物科技有限公司进行 Sanger 测序。

## 2.3.12 家蚕 circRNAs 的验证

为了验证已鉴定的 circRNA 的真实性, 随机选取不同表达水平的 6 种 circRNA, 根据每个 circRNA 的剪接位点, 分别设计发散性引物来进行 PCR, PCR 产物进一

步用 Sanger 测序进行证实, 用于验证 circRNA 引物序列如表 2-1。

表 2-1 circRNA 验证所用发散性引物序列

Table 2-1 Divergent Primers for circRNA Validation

引物名称	上游引物序列(5'to3')	下游引物序列(5'to3')
circRNA_0827	GGCTTCAGGTCTCTGTGAACG	CTCAAGGCTCTGTACGTGAGC
circRNA_1193	CATAGTCGTGTCCAACGGCTG	GAAGTTCGGCGTGCAGACGGA
circRNA_3493	TACCACCACAGGTCCAGCAG	GCTGGCGACGTTGTTGTTTCAG
circRNA_5655	CTTCTTCGGCTGCGAGCAAAG	TACTACTCGGGTGTCTGTTGCC
circRNA_6031	CCATGTTGAGATCGTCGGCTG	CCGGCGAGGTTGTAATAAACAG
circRNA_0962	GATCTCAGGAGTACCGCGTTG	TCTGGCGCAGGAAGTGAAACG

### 2.3.13 circRNA 表达水平的验证

为了验证来自 Circseq 的数据, 随机选择 5 个 circRNAs(circRNA\_1193, circRNA\_2439, circRNA\_5655, circRNA\_6031, circRNA\_0962)用实时定量 PCR 进行了验证。用于验证 circRNA 表达水平的特异的发散性引物如表 2-2 所示, 使用  $\beta$ -actin 基因为内参。

表 2-2 qPCR 验证所用发散性引物序列

Table 2-2 Divergent Primers for qPCR

引物名称	上游引物序列(5'to3')	下游引物序列(5'to3')
circRNA_1193	TCGGCGTGCAGACGGACCGA	CCAAATTTGCCACCATATCT
circRNA_5655	GCCAAACGCGAGACTCACTA	TTCGCACGCTGTTTCGCCGG
circRNA_6031	GCGCTGCGGTAATGAGGAAT	TCGCACATAACACGACAACCT
circRNA_0962	TTTCTGGCGCAGGAAGTGAA	GACGGCACTCGACTGCTTCT
circRNA_2439	CCGGACTACGACAACGAGCT	CCGTAGATGAAGGCGCACC
$\beta$ -actin	CTGCGTCTGGACTTGGC	CGAGGGAGCTGCTGGAT

## 3 结果与分析

### 3.1 家蚕中肠 circRNAs 的特性

用 CircSeq 研究了家蚕中肠 circRNAs 的表达, 通过高通量测序在对照家蚕中肠检测到数千个 circRNA 转录本。在去除低质量数据后, 从对照家蚕中肠的 101,981,470 个 raw reads 中得到 100,415,764 个 clean reads。从家蚕中肠中共鉴定出 9,753 个 circRNAs, 这些 circRNAs 的平均长度为 1,200nt, 而最大长度为 94,030nt,

最小长度仅为 54nt。家蚕 circRNA 候选物的大小范围从小于 200nt 至大于 2,000nt，其中大多数为 200nt 至 1,500nt（图 2-1A）。鉴定的 circRNAs 的 GC 含量范围为 45% 至 65%（图 2-1B）。

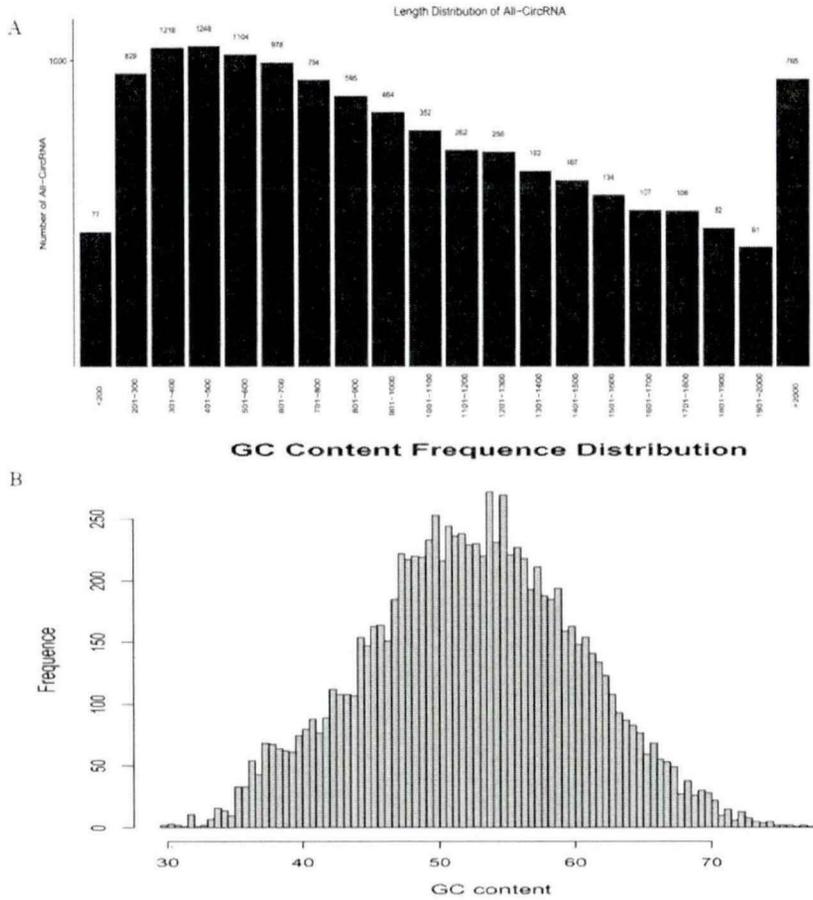


图 2-1 家蚕中肠 circRNAs 的特性

A: circRNA 的长度分布; B: 中肠 circRNA 的 GC 含量

Fig 2-1 Characterization of the identified circRNAs from the silkworm midgut

A: The length distribution of the identified circRNAs; B: The GC content of the identified circRNAs in the midgut

通过反向剪接形成的 circRNAs 不同于线性 RNA 的经典剪接，但它们通常都是通过前体 mRNA 的可变剪接形成的。为了全面了解 circRNAs 的起源，对相应基因的 circRNAs 的线性转录本进行了注释，并且根据 circRNA 序列在染色体上的位置分析 circRNA 在基因组中的分布。结果显示，根据基因组中 circRNAs 的定位，可将 circRNAs 分为 5 类，包括 93.79% 有义重叠 circRNAs, 3.12% 外显子 circRNAs, 2.29% 基因间 circRNAs, 0.29% 内含子 circRNAs 和 0.34% 反义 circRNAs，其中大

多数 circRNAs 都来源于有义重叠方式 (图 2-2)。比较试验样品和对照样品之间 circRNAs 的来源, 没有观察到 circRNAs 的起源在二种样品间存在显著差异, 表明 circRNA 的形成机制不受 BmCPV 感染所影响 (图 2-2)。

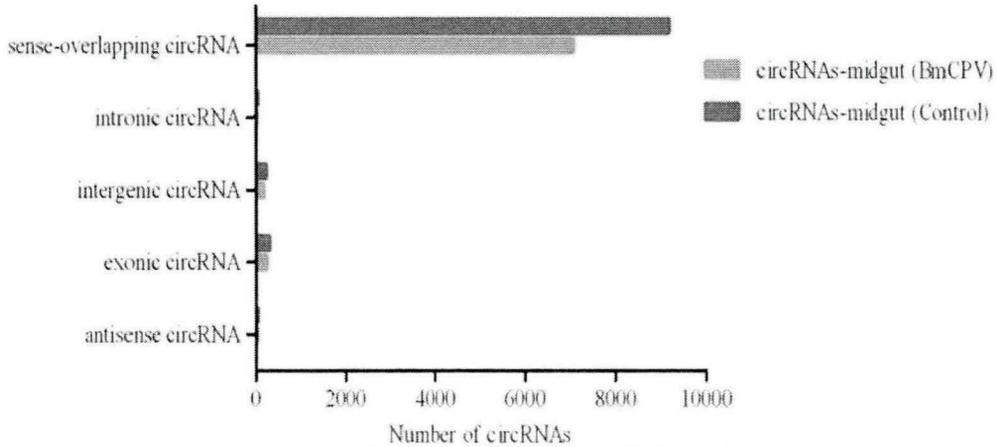


图 2-2 家蚕中肠 circRNAs 的种类和数目

Fig 2-2 Types and numbers of circRNAs detected from the midguts of silkworms

circRNAs 的剪接信号位点分析结果显示, 家蚕中肠中的大多数 circRNAs 剪接信号为典型的 GT/AG 序列, 与哺乳动物相似 (图 2-3)。使用发散性引物来验证试验样品的 circRNAs, 发现家蚕中肠中的 circRNAs 存在可变剪接, 一对发散引物可以同时鉴定到带有不同 back-spliced junctions 的 circRNAs。这些结果表明, circRNAs 的环状可变剪接具有普遍性。

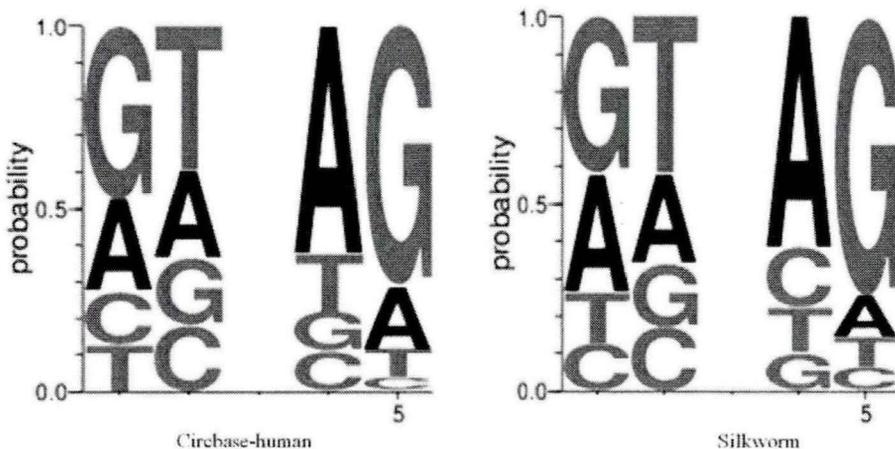


图 2-3 人类和家蚕 circRNAs 的剪接信号

Fig 2-3 Splice signals of the identified circRNAs in humans and silkworms

### 3.2 差异表达 circRNAs 的线性转录本的注释及鉴定

高通量测序是研究 RNA 生物学功能的有效方法。CircSeq 分别在对照和试验样

品中检测到9,753和7,475个circRNAs。基于RPM调查了BmCPV感染的中肠和对照家蚕中肠中circRNAs的表达水平,结果显示在检测样品中没有发现异常表达(图2-4A)。两个样品中共表达的circRNAs有6085个,而在对照和试验样品中特异性表达的circRNAs分别为646和737个(图2-4B)。

在BmCPV感染的中肠中, CircSeq共鉴定出3638个表达失调的circRNAs。在对照和试验样本中,通过过滤分析发现BmCPV感染后400个circRNAs呈显著性差异表达(倍数变化 $\geq 2.0$ ,  $p < 0.05$ ,  $FDR < 0.05$ ),其中294个上调,106个下调(图2-4C, D)。circRNA\_3112(倍数变化:  $\sim 2544$ )是BmCPV感染后上调表达最多的circRNAs之一,它属于有义重叠circRNA,且其最密切相关的线性转录物是家蚕血影蛋白 $\beta$ 链非红细胞型(XM\_012689500.1)。而circRNA\_4672是下调表达最多的circRNA,它也属于有义重叠circRNA,并且其最密切相关的线性转录物是家蚕钠依赖性营养氨基酸转运蛋白(XM\_004926983.2)。

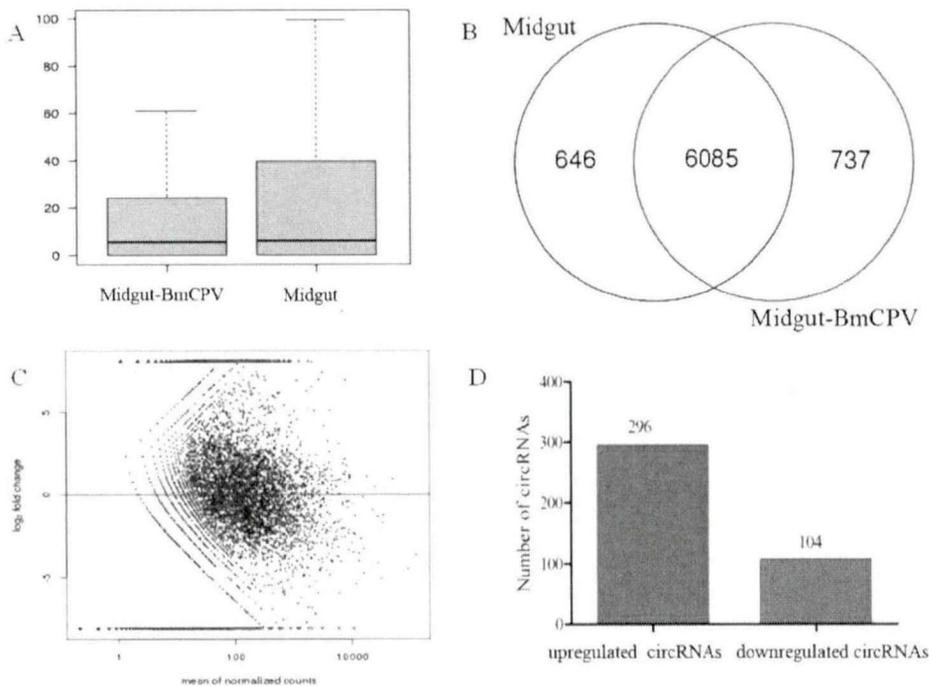


图 2-4 正常中肠和 BmCPV 感染中肠 circRNAs 的表达谱

A: BmCPV 感染中肠和对照中肠中 circRNAs 的 RPM 值; B: 正常中肠和 BmCPV 感染中肠中 circRNAs 的 Venn 分析; C: 差异表达的 circRNAs; D: 正常中肠和 BmCPV 感染中肠中 circRNAs 之间的显著差异表达(倍数变化 2.0,  $p < 0.05$  和  $FDR < 0.05$ )

Fig 2-4 Expression profiles of circRNAs detected by CircSeq in normal midguts and BmCPV-infected midguts

A: Box plots of the RPM value of the circRNAs in two groups; B: Venn analysis of the circRNAs detected in normal and BmCPV-infected silkworm midguts; C: MA of differential expression circRNAs; D: The significant differential expression of circRNAs between normal and BmCPV-infected silkworm midguts (fold change 2.0,  $p < 0.05$  and FDR  $< 0.05$ )

基于其倍数变化的差异表达前 20 的 circRNAs 如表 2-3 所示。根据预测的 circRNA-miRNA 网络,家蚕神经肽受体 A35(NGR-A35)和家蚕 Wnt1(WNT-1) 蛋白受差异表达前 20 的 circRNAs(circRNA\_5655、circRNA\_9582)的调控。

表 2-3 在 BmCPV 感染中肠中差异表达前 20 的 circRNAs

Table 2-3 The top 20 dysregulated circRNAs in BmCPV infected midgut

Name	Fold Change	log2FoldChange	P value	Type	Best related linear transcript(Gene symbol)
Upregulation					
circRNA_3112	2544.289157	11.31304693	0.001624	sense-overlapping	XM_012689500.1
circRNA_9582	1605.325301	10.64864996	0.002667	sense-overlapping	XM_012696726.1
circRNA_9081	1479.120482	10.53052386	0.002946	sense-overlapping	XM_012696281.1
circRNA_7454	1206.518072	10.23663381	0.00267	sense-overlapping	XM_012694536.1
circRNA_2952	999.5421687	9.965123622	0.00494	sense-overlapping	XM_012689347.1
circRNA_3493	822.8554217	9.684495157	0.006523	antisense	XM_012689767.1
circRNA_5655	777.4216867	9.602553543	0.007092	sense-overlapping	XM_012694348.1
circRNA_4553	772.373494	9.593154845	0.004362	sense-overlapping	NM_001113265.1
circRNA_3101	742.0843373	9.535439347	0.004579	sense-overlapping	XM_012689500.1
circRNA_6031	731.9879518	9.515676092	0.007758	sense-overlapping	XM_012692613.1
Downregulation					
circRNA_0327	0.004432127	-7.817785029	0.018598	sense-overlapping	XM_012690535.1
circRNA_2873	0.003871313	-8.012961152	0.015695	sense-overlapping	XM_004924781.2
circRNA_8162	0.002981583	-8.389705771	0.021277	sense-overlapping	XM_012695334.1
circRNA_6649	0.002857468	-8.451047141	0.008593	sense-overlapping	XM_004929799.2
circRNA_3450	0.00251404	-8.635776552	0.008501	sense-overlapping	XM_012689737.1
circRNA_1875	0.002031466	-8.943263134	0.007605	sense-overlapping	XM_012697844.1
circRNA_8700	0.00194236	-9.007973916	0.007277	sense-overlapping	XM_004932630.2
circRNA_3508	0.001897856	-9.041413396	0.025578	sense-overlapping	XM_004925402.1
circRNA_7474	0.001783184	-9.131329032	0.006708	sense-overlapping	XM_004930980.2
circRNA_4672	0.000545456	-10.84025027	0.003145	sense-overlapping	XM_004926983.2

### 3.3 差异表达 circRNAs 亲本基因 GO 和 KEGG 通路分析

circRNA 的功能可能与其宿主线性转录本的已知功能相关,为进一步分析家蚕 circRNAs 对 BmCPV 感染的应答,对差异表达前 20 的 circRNAs 的亲本基因进行 GO 富集分析 (BP, CC 和 MF 途径) 以注释基因功能。选择  $p$  值小于 0.05 的预测条目,并按其  $p$  值进行排序。根据常规 GO 分类算法,用富集分数表示差异表达基因富集

显著性的GO条目。对于上调的circRNAs, 在生物过程(Biological process, BP)亚类中, 位于前三的GO进程包括通过质膜粘附分子的嗜同性细胞粘附、磷脂转运和细胞通讯。驱动蛋白复合物、微管和肌球蛋白复合物在细胞组成(Cellular component, CC)亚类中位于前三。镁离子结合、磷脂酰肌醇结合和磷脂易位ATP酶活性在分子功能(Molecular function, MF)亚类中位于前三(图2-5A)。对于下调的circRNAs, 生物过程中的前三个进程是跨膜转运、氧化还原过程和转运。细胞组成中的前三个进程是膜的整体组分、膜和细胞核。分子功能中的前三个进程是催化活性、氧化还原酶活性和水解酶活性(图2-5B)。

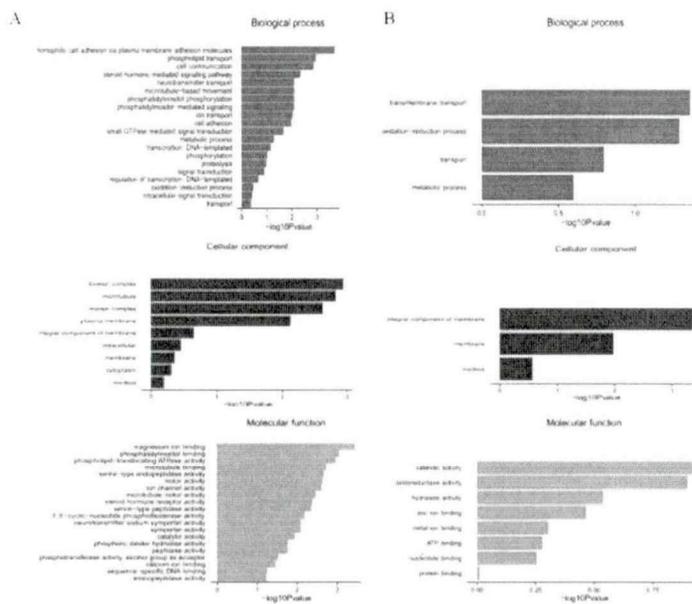


图 2-5 通过 BP, CC 和 MF 途径对上调(左图)和下调(右图) circRNAs 进行 GO 分析

Fig 2-5 GO analysis of the up-regulated (left panel) and down-regulated (right panel) circRNAs of the control and test groups under the themes of BP, CC, and MF

此外, 在上调和下调的circRNAs的亲本基因中分别鉴定出69和38个KEGG途径( $p < 0.05$ )。在差异表达的circRNAs中排名前20的KEGG途径如图2-6所示, 其中包含Notch信号转导途径, ABC转运蛋白和FoxO信号转导途径。

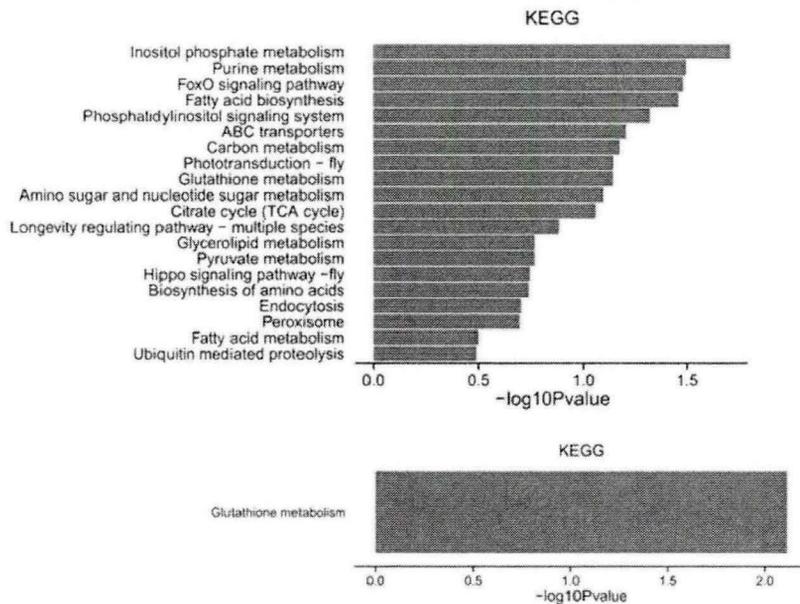


图 2-6 显著上调 (上图) 和下调 (下图) mRNA 的 20 个 KEGG 通路  
 Fig 2-6 20 KEGG pathways of significantly up-regulated (upper panel) and down-regulated (lower panel) mRNAs

### 3.4 circRNA-miRNA 交互网络的构建

根据高通量RNA测序结果构建circRNA-miRNA相互作用网络, 构建的调节网络图包含了circRNAs和miRNAs之间互作关系前300名, 对此互作关系按超几何分布的p值进行排序。比较试验和对照样品的circRNA-miRNA网络, 结果显示在与BmCPV感染密切相关的前300个互作中, 有13个miRNAs与193个circRNAs互作(图2-7), 并且circRNA\_9444、circRNA\_8115、circRNA\_4553和circRNA\_6649都与bmo-miR-278-3p相结合。

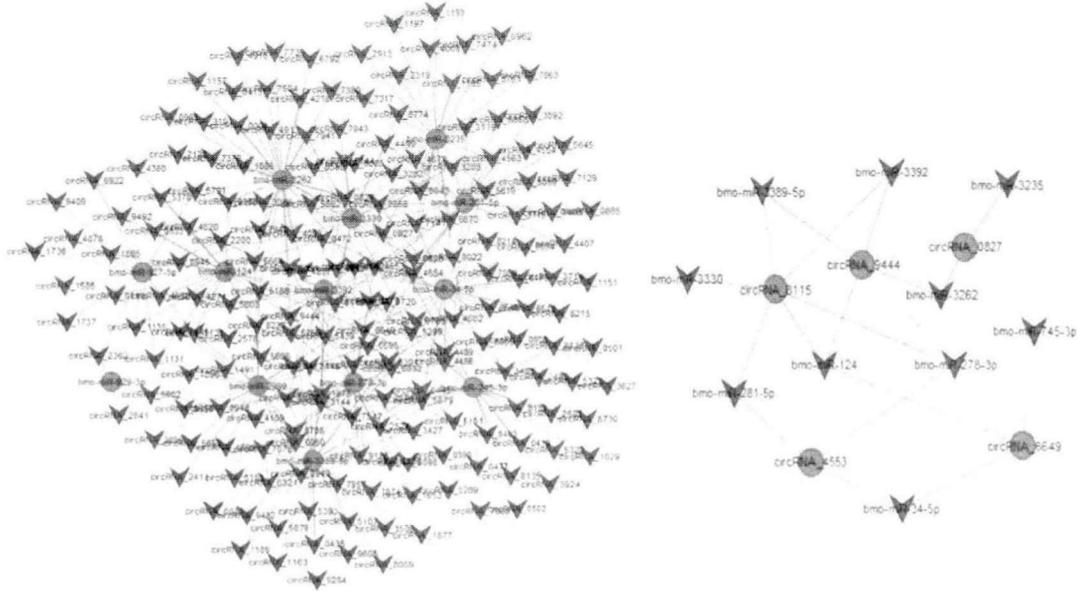


图 2-7 BmCPV 感染家蚕中肠的 circRNA-miRNA 互作网络 (三角形代表 circRNAs 和圆形代表 miRNAs)

Fig 2-7 The circRNA-miRNA co-expression network in the silkworm midgut infected with BmCPV compared with that of the normal midgut(Triangle nodes represent circRNAs and circle nodes represent miRNAs)

### 3.5 家蚕 circRNAs 的验证

根据测序结果, 随机选择 6 个 circRNAs 用发散性引物进行验证。使用发散性引物来扩增预期大小的不同产物, 并通过 Sanger 测序验证 (图 2-8)。实验证明测序结果与预测结果一致。

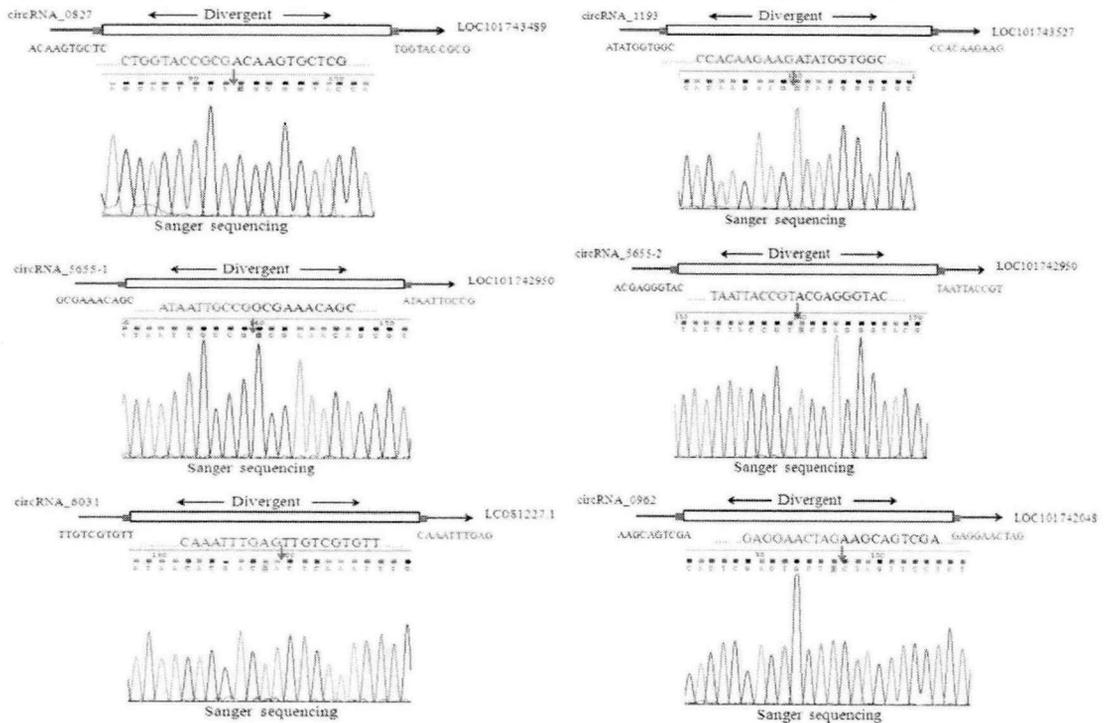


图 2-8 通过 RT-PCR 和 Sanger 测序验证 circRNA 表达(箭头处表示 circRNAs 的拼接位点)

Fig 2-8 Validation of circRNA expression by RT-PCR and Sanger sequencing(The arrows indicates the junction site of circRNAs)

为了解 BmCPV 感染后 circRNAs 表达水平的变化,对 5 种 circRNAs 的表达水平(circRNA\_1193, 2439, 5655, 6031 和 0962)进行了研究,结果显示所选择的 circRNAs 的表达水平的变化是由 BmCPV 感染引起(图 2-9),且表达趋势与 CircSeq 结果一致。

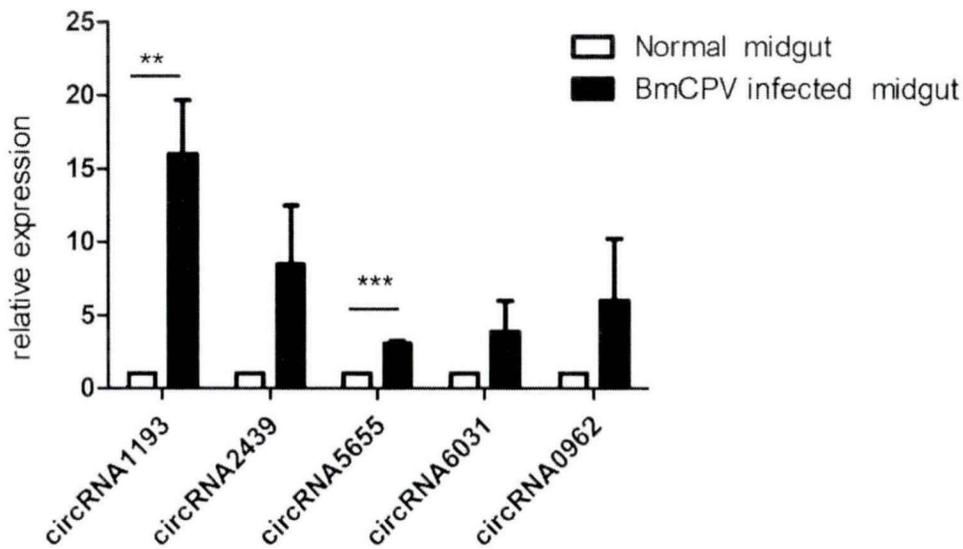


图 2-9 circRNAs 表达量验证 (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )

Fig 2-9 Validation of the expression of circRNAs (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )

在不同发育阶段的家蚕中肠中荧光定量 PCR 检测了 circRNA\_6031 和 circRNA\_0962 的相对表达丰度, 结果显示, 家蚕 circRNA\_6031 在 5 龄 3 天中肠组织中的相对表达丰度最高, 上调了 2.31 倍 (图 2-10A)。circRNA\_0962 在二龄三天中肠组织中的表达水平最高, 而在三龄三天、四龄四天和五龄三天中肠中 circRNA\_0962 的表达水平很低 (图 2-10B)。

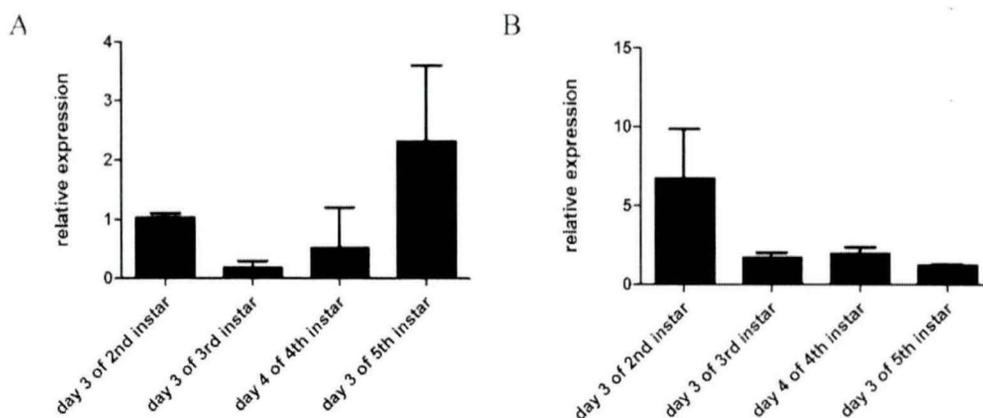


图 2-10 不同发育阶段家蚕中肠中 circRNAs 的相对表达丰度

A: circRNA\_6031 的相对表达丰度; B: circRNA\_0962 的相对表达丰度

Fig 2-10 The relative abundance of circRNAs in midgut in diverse developmental stage

A: Relative abundance of circRNA\_6031; B: Relative abundance of circRNA\_0962

为进一步明确家蚕 circRNAs 的表达模式，我们分别在五龄三天家蚕的性腺、丝腺、马氏管、头、脂肪体、中肠组织中荧光定量 PCR 检测家蚕 circRNAs 的相对表达丰度。结果显示 circRNA\_6031 的相对表达丰度在丝腺中最高，其他组织中表达水平差异不大（图 2-11A）。circRNA\_0962 在头部表达水平最高，上调了 10 倍左右，而在丝腺中表达水平最低（图 2-11B）。

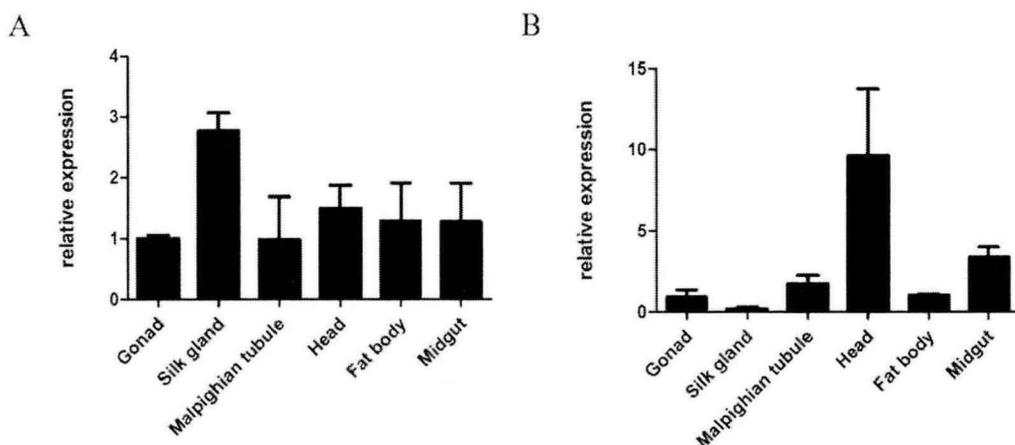


图 2-11 家蚕五龄三天不同组织中 circRNAs 的相对表达丰度

A: circRNA\_6031 的相对表达丰度； B: circRNA\_0962 的相对表达丰度

Fig 2-11 The relative abundance of circRNAs in diverse tissues in 3<sup>rd</sup> day of 5th instar

A: Relative abundance of circRNA\_6031; B: Relative abundance of circRNA\_0962

#### 4 讨论

BmCPV 是一种家蚕特异性病原体，可以经口感染。已许多研究报道了 BmCPV 感染后 mRNAs 和 miRNAs 表达水平的变化，全面阐释了这些 RNA 在病毒感染过程中的功能。circRNA 发现于 20 世纪 90 年代，是一种由反向剪接（环化）方式形成的新型非编码 RNA<sup>[16,30]</sup>。目前已经在不同细胞系和不同物种中鉴定了许多 circRNA。但至今我们仍不知道这种 circRNAs 是否在无脊椎动物的家蚕中转录，以及这些新型 circRNAs 的表达是否受 BmCPV 感染的影响。为了更好地理解这些问题，在本研究中对 BmCPV 感染中肠和正常的家蚕中肠进行高通量测序分析。在正常和 BmCPV 感染的家蚕中肠中发现了数千种 circRNAs，与在人类及其他物种中被鉴定出来的 circRNAs 一样，这些 circRNAs 具有类似的特性。例如，大多数家蚕 circRNAs 的形成机制与其他物种类似，都是利用保守的 GT/AG 剪接信号，

而 BmCPV 感染对 circRNA 的形成机制无影响。反向剪接和外显子跳跃被认为是产生哺乳动物外显子 circRNAs 的两种不同机制<sup>[31]</sup>。经典的剪接体被用于进行反向剪接<sup>[32]</sup>。通过比较分析,我们得出结论:家蚕 circRNAs 的形成机制使用保守的经典 GT/AG 剪接信号,并且该机制在 BmCPV 感染的反应中没有变化,这表明 circRNA 的选择性环化是家蚕的共同特征。在本研究中发现的一个有趣的现象,在家蚕 circRNAs 中存在可变剪接亚型。起源于反向剪接的外显子的 circRNAs 与它们的线性转录本共表达。单个基因座可以通过可变反向剪接位点选择和/或可变剪接位点的选择产生多种 circRNAs<sup>[33]</sup>。已有的研究结果显示, circRNAs 的可变剪接也普遍存在于 10 种人细胞系和 62 种果蝇样品<sup>[34]</sup>。因此,可以认为这种可变剪接不同物种中是保守的。在 BmCPV 感染的家蚕中肠中,相同亲本基因线性转录本可表达不同类型的 circRNAs,这暗示着它们在中肠 circRNAs 的调节中起重要作用。RNA 错误的选择性剪接被认为是一些癌症发生的重要因素,这与 BmCPV 感染是否相关有待进一步地研究<sup>[35]</sup>。

BmCPV 感染后,许多 mRNAs 和 miRNAs 的表达模式发生了变化。然而,BmCPV 感染后家蚕 circRNAs 的表达模式尚不明确。因此在本研究中,用 CircSeq 研究了 circRNA 的表达水平,结果显示在正常和 BmCPV 感染的中肠中分别有 646 和 737 个 circRNAs 特异性表达,且这两个样品有 6085 个相同的 circRNAs。其中,在 BmCPV 感染的中肠中鉴定出 294 个上调和 106 个下调的 circRNAs (倍数变化  $\geq 2.0$ ,  $p < 0.05$  和  $FDR < 0.05$ )。

此外,通过 GO 和 KEGG 分析探讨 BmCPV 感染后家蚕 circRNAs 的生物学功能及其潜在的作用机制。GO 富集分析显示,一些基因涉及生物过程,细胞组成和分子功能的调节。本研究发现在上调的 circRNAs 的分子功能中,排名前三的 GO 条目分别为镁离子结合、磷脂酰肌醇结合和磷脂易位 ATP 酶活性。在下调 circRNAs 的分子功能中,排名前三的是催化活性、氧化还原酶活性和水解酶活性。显然,差异表达 circRNAs 的 KEGG 通路包括 Notch 信号通路, ABC 转运蛋白和 FoxO 信号通路。这些发现表明,一些 circRNAs 可能参与了 BmCPV 感染的发展和进展。

BmCPV 特异性感染家蚕中肠的上皮细胞,伴随疾病的发展,中肠后部呈乳白色,因此中肠的吸收和消化功能受到巨大损伤。对失调的前 20 的 circRNAs 的下游 miRNAs 的靶基因进行分析,结果显示它们中的大多数参与运输和吸收,这表明这

些基因表达量的减少可能造成了蚕的发育迟缓。此外，由于中肠蠕动涉及消化和排便，BmCPV感染的蚕会失去食欲并且变得懒散，这可能是动力蛋白和驱动蛋白基因表达水平下调所致。

当用BmCPV感染蚕时，家蚕免疫系统被激活以产生免疫球蛋白样的蛋白和抗病毒因子。在本研究中，许多免疫基因表达水平上调，且它们是排名前20的上调circRNAs的下游miRNAs的靶基因。据报道，circRNAs可充当miRNA海绵起作用，能够自然隔离和竞争性抑制miRNA活性以调节靶基因表达。在BmCPV感染后，在家蚕中肠中鉴定出数百个差异表达的circRNAs，这可能有助于研究circRNA和miRNA之间的相互作用。许多环状RNA起着海绵作用，如CiRS-7、性别决定区域Y和CircHIPK3，都包含许多miRNA的结合位点<sup>[2,13,16]</sup>。鉴于miRNAs在BmCPV感染的进程中起着重要作用，一些circRNAs可能通过与miRNAs相互作用参与BmCPV感染进程。在本研究中，建立了circRNA-miRNA相互作用网络，以预测circRNAs和miRNAs之间的关系。基于序列分析，在大多数鉴定的circRNAs中发现了一个或多个miRNA结合位点，例如bmo-miR-278-3p可结合circRNA\_9444, circRNA\_8115, circRNA\_4553和circRNA\_6649。之前的研究表明bmo-miR-278-3p能够负调控家蚕幼虫胰岛素相关肽结合蛋白基因的表达，且它可以正向调节BmCPV的mRNA转录水平<sup>[36]</sup>。表明bmo-miR-278-3p可能与宿主基因组编码的circRNAs相互作用，从而在BmCPV复制中发挥重要作用。从相互作用网络可以看出，bmo-miR-3389-5p, bmo-miR-745-3p和bmo-miR-3262分别与30, 34和34个circRNAs相关。circRNA\_8115, circRNA\_9444, circRNA\_4553, circRNA\_0827和circRNA\_6649分别含有6、5、4、4和4个miRNA的结合位点。这些结果表明，circRNAs可能通过结合调节相关基因表达的miRNAs来影响BmCPV感染的进程，尽管确切的调节机制仍需要进一步地研究。

总之，这些发现为将来防治BmCPV感染提供了潜在的靶标，并且为BmCPV感染生物学提供了新的视角。对本研究中鉴定的circRNAs的后续研究，将集中于它们与BmCPV感染及其生物学功能的关联。

## 参考文献

- [1] Kosik KS. Molecular biology: Circles reshape the RNA world[J]. *Nature*, 2013, 495:322-4.
- [2] Zheng Q, Bao C, Guo W, et al. Circular RNA profiling reveals an abundant circHIPK3 that regulates cell growth by sponging multiple miRNAs[J]. *Nat Commun*, 2016, 7:11215.
- [3] Abe N, Abe H, Ito Y. Dumbbell-shaped nanocircular RNAs for RNA interference[J]. *J Am Chem Soc*, 2007, 129:15108-9.
- [4] Bohjanen PR, Colvin RA, Puttaraju M, et al. A small circular TAR RNA decoy specifically inhibits Tat-activated HIV-1 transcription[J]. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24:3733-8.
- [5] Umekage S, Kikuchi Y. In vitro and in vivo production and purification of circular RNA aptamer[J]. *J Biotechnol*, 2009, 139:265-72.
- [6] Abe N, Abe H, Nagai C, et al. Synthesis, structure, and biological activity of dumbbell-shaped nanocircular RNAs for RNA interference[J]. *Bioconjugate Chem*, 2011, 22:2082-92.
- [7] Kos A, Dijkema R, Amberg AC, et al. The hepatitis delta (delta) virus possesses a circular RNA[J]. *Nature*, 1986, 323:558-60.
- [8] Flores R, Grubb D, Elleuch A, et al. Rolling-circle replication of viroids, viroid-like satellite RNAs and hepatitis delta virus: variations on a theme[J]. *RNA Biol*, 2011, 8:200-6.
- [9] Lykke-Andersen J, Aagaard C, Semionenkova M, et al. Archaeal introns: splicing, intercellular mobility and evolution[J]. *Trends in biochemical sciences*, 1997, 22:326-31.
- [10] Zhang X, Yan Y, Lei X, et al. Circular RNA alterations are involved in resistance to avian leukosis virus subgroup-J-induced tumor formation in chickens[J]. *Oncotarget*, 2017, 8:34961-70.
- [11] Shen Y, Guo X, Wang W. Identification and characterization of circular RNAs in zebrafish[J]. *FEBS Letters*, 2017, 591:213-20.
- [12] Zhang C, Wu H, Wang Y, et al. Circular RNA of cattle casein genes are highly expressed in bovine mammary gland[J]. *J Dairy Sci*, 2016, 99:4750-60.
- [13] Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, et al. Natural RNA circles function as efficient

- microRNA sponges[J]. Nature, 2013, 495:384–8.
- [14] Du WW, Yang W, Liu E, et al. Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression via forming ternary complexes with p21 and CDK2[J]. Nucleic Acids Res, 2016, 44:2846–58.
- [15] Peng L, Yuan XQ, Li GC. The emerging landscape of circular RNA ciRS-7 in cancer (Review) [J]. Oncol Reports, 2015, 33:2669–74.
- [16] Capel B, Swain A, Nicolis S, et al. Circular transcripts of the testis-determining gene Sry in adult mouse testis[J]. Cell, 1993, 73:1019–30.
- [17] Liu Q, Zhang X, Hu X, et al. Circular RNA Related to the Chondrocyte ECM regulates MMP13 expression by functioning as a MiR-136 ‘Sponge’ in human cartilage degradation[J]. Scientific Reports, 2016, 6:22572.
- [18] Ashwal-Fluss R, Meyer M, Pamudurti NR, et al. circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing[J]. Mol Cell, 2014, 56:55–66.
- [19] Shen T, Han M, Wei G, et al. An intriguing RNA species—perspectives of circularized RNA[J]. Protein Cell, 2015, 6:871–80.
- [20] Panda AC, Grammatikakis I, Munk R, et al. Emerging roles and context of circular RNAs[J]. Wiley Interdisciplinary Rev RNA, 2017, 8.
- [21] Wang Y, Wang Z. Efficient backsplicing produces translatable circular mRNAs[J]. Rna, 2015, 21:172–9.
- [22] 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:e68209.
- [23] Kolliopoulou A, Van Nieuwerburgh F, Stravopodis DJ, Deforce D, et al. Transcriptome analysis of *Bombyx mori* larval midgut during persistent and pathogenic cytoplasmic polyhedrosis virus infection[J]. PloS One, 2015, 10:e0121447.
- [24] Gao K, Deng XY, Qian HY, et al. Digital gene expression analysis in the midgut of 4008 silkworm strain infected with cytoplasmic polyhedrosis virus[J]. J Invertebrate Pathol, 2014, 115:8–13.
- [25] Gao K, Deng XY, Qian HY, et al. Cytoplasmic polyhedrosis virus-induced differential gene expression in two silkworm strains of different susceptibility[J]. Gene, 2014, 539:230–7.
- [26] Gao K, Deng XY, Shang MK, et al. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis

- of midgut in silkworm infected with *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus[J]. *J Proteomics*, 2017, 152:300–11.
- [27] Hu X, Zhu M, Wang S, et al. Proteomics analysis of digestive juice from silkworm during *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus infection[J]. *Proteomics*, 2015, 15:2691–700.
- [28] Enright AJ, John B, Gaul U, et al. MicroRNA targets in *Drosophila*[J]. *Genome Biol*, 2003, 5:R1.
- [29] Pasquinelli AE. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship[J]. *Nat Rev Genetics*, 2012, 13:271–82.
- [30] Nigro JM, Cho KR, Fearon ER, et al. Scrambled exons[J]. *Cell*, 1991, 64:607–13.
- [31] Jeck WR, Sharpless NE. Detecting and characterizing circular RNAs[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32:453–61.
- [32] Starke S, Jost I, Rossbach O, et al. Exon circularization requires canonical splice signals[J]. *Cell Reports*, 2015, 10:103–11.
- [33] Zhang XO, Dong R, Zhang Y, et al. Diverse alternative back-splicing and alternative splicing landscape of circular RNAs[J]. *Genome Res*, 2016, 26:1277–87.
- [34] Gao Y, Wang J, Zheng Y, et al. Comprehensive identification of internal structure and alternative splicing events in circular RNAs[J]. *Nat Commun*, 2016, 7:12060.
- [35] Scotti MM, Swanson MS. RNA mis-splicing in disease[J]. *Nat Rev Genetics*, 2016, 17:19–32.
- [36] Wu P, Qin G, Qian H, et al. Roles of miR-278-3p in IBP2 regulation and *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus replication[J]. *Gene*, 2016, 575:264–9.

## 第三章 家蚕 circRNA\_5655 的功能及作用机制

**摘要：**家蚕 circRNA\_5655 序列长度为 563bp，由家蚕 histone-lysine N-methyltransferase eggless (LOC101742950) 基因的第 9-13 外显子环化而成。RT-qPCR 结果显示过表达 circRNA\_5655 后其亲本基因 LOC101742950 的转录水平显著降低，但 Western blotting 检测结果显示组蛋白甲基化水平却有所升高。细胞免疫荧光结果显示，circRNA\_5655 在核、质中均有分布，而 circRNA\_5655 与家蚕 NF90 蛋白具有非序列依赖性共定位。通过 circRNA-miRNA pull down 和双荧光素报告系统证实，circRNA\_5655 能够起到 bmo-miR-3391-5p 海绵作用从而激活下游靶基因家蚕组蛋白去乙酰化酶 Rpd3 (*Bombyx mori* histone deacetylase Rpd3, XM\_004931383.2) 和家蚕神经肽受体 A35 (*Bombyx mori* neuropeptide receptor A35, NM\_001134279.1) 的表达。通过 RT-qPCR 检测过表达 circRNA\_5655 细胞中凋亡相关基因的表达水平，发现过表达 circRNA\_5655 可导致家蚕 p53 样蛋白基因 (*Bombyx mori* p53-like protein mRNA, KC243147.1)、家蚕信号转导和转录激活因子 STAT 基因 (*Bombyx mori* signal transducer and activator of transcription, NM\_001163916.1)、家蚕 survivin-1 基因 (*Bombyx mori* survivin-1, XM\_012688679.2) 表达水平下调 ( $p < 0.05$ )。流式细胞术显示，过表达 circRNA\_5655 促进细胞增殖并抑制细胞凋亡。通过 circRNA-protein pull down 和质谱鉴定发现，circRNA\_5655 可能与线粒体硫胺素焦磷酸盐载体、琥珀酸脱氢酶组装因子 2-B、动力蛋白  $\beta$  链等蛋白质相互作用。另外，我们还发现过表达 circRNA\_5655 对 BmCPV 增殖复制有抑制作用，但随着 circRNA\_5655 浓度的增加抑制减弱。

**关键词：**circRNA\_5655；miRNA 海绵作用；组蛋白甲基化；细胞增殖与凋亡；表达模式；BmCPV

### 1 引言

随着 RNA 深度测序技术与生物信息学的高速发展，已发现 circRNAs 在不同物种中广泛表达<sup>[1-6]</sup>。典型的 circRNA 由反向剪接产生，即 3' 末端和 5' 末端通过共价键连接而成<sup>[7-9]</sup>。环状 RNA 本质上对核酸外切酶具有抗性，这使得它相比于线

性 RNA 具有更高的稳定性, 并且 circRNAs 具有组织或发育阶段特异性<sup>[2,10,11]</sup>, 这也暗示了它们具有重要的生物功能。到目前为止, 已经证明 circRNA 可以作为 microRNA 海绵<sup>[12-14]</sup>, 对神经元有调节作用<sup>[15]</sup>, 并能够调控细胞核基因转录<sup>[16]</sup>。circRNA 还可以结合、存储、分类和隔离蛋白质, 并作为蛋白质-蛋白质互作调节的动态支架<sup>[17]</sup>。如一种由人白细胞介素增强子结合因子 3(human interleukin enhancer binding factor 3)ILF3 基因产生的 dsRNA 结合蛋白 NF90/NF110, 能够直接调节 circRNA 的反向剪接并且对病毒感染产生响应<sup>[18]</sup>。NF90/NF110 在核内促进 circRNA 生物发生, 还能与细胞质中成熟的 circRNA 相结合。病毒感染后, 部分 NF90/NF110 核输出到细胞质, 同时一些 NF90/NF110 从 circRNP 复合物上释放出来, 并与病毒 mRNA 结合来响应抗病毒免疫。并且这种效应不具有序列依赖性, 因此多种 circRNAs 可以与此类蛋白质相关联以响应免疫应答。circRNA 通常被认为是非编码 RNA<sup>[3,12,15]</sup>, 但是最新的研究报告显示, 环状 RNA 上一些短开放阅读框(sORFs)可以编码功能性小肽<sup>[19-24]</sup>, 例如一些内源性 circRNAs circZNF609, circMbl, circ-FBXW7 和 circSHPRH 都能够在体内进行翻译<sup>[25-29]</sup>。

家蚕质型多角体病毒(*Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus, BmCPV)是呼肠孤病毒科质型多角体病毒属的典型种, 其多角体蛋白包涵体内含有塔状单层衣壳, 感染性衣壳内包含 10 段双链 RNA(dsRNA)基因组<sup>[30]</sup>和 6 种结构蛋白<sup>[31]</sup>, 能够侵入中肠细胞并调控内源 RNA 转录<sup>[32]</sup>。已知 BmCPV 的 S1 片段主要参与病毒粒子的装配, 而 S7 片段可编码结构蛋白 VP7(55kDa 左右), 与 BmCPV 病毒的增殖复制密切相关<sup>[33]</sup>。

前面我们通过高通量测序技术, 对 BmCPV 感染后家蚕来源的 circRNAs 进行了鉴定及功能注释, 推测这些家蚕 circRNAs 可能参与宿主基因的表达调控, 并对 BmCPV 病毒的增殖复制有所影响。

家蚕 circRNA\_5655 是由 histone-lysine N-methyltransferase eggless (LOC101742950)基因的第 9-13 外显子环化而成, BmCPV 感染后, 其表达水平明显提高。本研究通过构建 circRNA\_5655 过表达载体, 探讨了其对宿主亲本基因、家蚕免疫凋亡基因、细胞周期及凋亡、BmCPV 增殖复制的影响。通过 circRNA-miRNA pull down 和双荧光素报告系统, 建立了 circRNA\_5655-bmo-miR-3391-5p-家蚕组蛋白去乙酰化酶 Rpd3 的互作网络。并通过

circRNA-protein pull down 和质谱鉴定 RBPs, 发现 circRNA\_5655 可能与一些蛋白互作发挥功能。另外还发现 circRNA\_5655 对 BmCPV 病毒的增殖复制有反馈调节作用。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 载体、菌种与生物材料

载体: 体内成环载体 pIZT-LcR、无缝克隆的 pIZT-LcR-5655 体内成环载体均由苏州泓迅生物技术有限公司构建; 萤火虫荧光素酶报告载体 pOtu-Luc-mtX 由本实验室朱敏构建并保存; 海肾荧光素酶载体 pRL-TK 均由苏州大学卫正国老师馈赠。

菌种: Trans5 $\alpha$  购自北京全式金生物公司(TransGen Biotech)

生物材料:

家蚕卵巢细胞系(BmN)由本实验室保存; 家蚕 NF90 鼠抗由本实验室蒋梦生制备并保存; BmCPV VP7 鼠抗由本实验室何蕾制备; 家蚕质型多角体病毒(BmCPV)由苏州大学基础医学与生物科学学院分子生物学研究室保存。

#### 2.1.2 工具酶及试剂盒

T7 RNA Polymerase、Streptavidin Agarose Resin、RNA-Protein Pull-Down 试剂盒均为 Thermo fisher 公司产品。Dual-Luciferase Reporter Assay System 试剂盒为 Promega 公司产品。Trypsin-EDTA Solution 购于 BBI 生命科技公司。SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒均购于 Beyotime 公司。Annexin V-PE/7-AAD 凋亡检测试剂盒购于北京博奥龙免疫技术有限公司。T4 RNA Ligase 1 为 New England Biolabs 产品。24 孔板专用细胞爬片为 WHB 公司产品。Streptavidin(Cy3)抗体为 Gene Tex 产品。

#### 2.1.3 其他试剂

昆虫细胞培养基 TC-100 购于 GIBCOBRL 公司。胎牛血清(FBS)购于 BI 公司。Zeocin 抗生素、Tris 碱均购于 Solarblo 公司。脂质体为 Roche (德国) 公司产品。Stable Peroxide Solution 稳定剂和 Luminol/Enhancer Solution 增强剂均购于 Thermo 公司。牛血清白蛋白(BSA)、双色预染蛋白 Marker 均购于为上海生工生物工程有

限公司。 $\alpha$ -Tubulin 抗体购于 Protein tech。组蛋白 H3K9me3 多克隆抗体购于 Absin 公司。HRP 标记山羊抗鼠 IgG、HRP 标记山羊抗兔 IgG 均购于 TIANGEN 公司。Cy3 标记山羊抗兔 IgG 购于 Servicebio 公司。防荧光淬灭封片剂(Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium)购于 Sigma 公司。DAPI 购于 Biosharp 公司。

其他试剂同第二章。

#### 2.1.4 常用仪器见附录二

### 2.2 试剂配制

#### 2.2.1 昆虫细胞培养基

TC-100 培养基	22.09g
碳酸氢钠	0.35g

粉末溶解于去离子水，调 pH 至 6.10，并定容至 1L。0.22 $\mu$ m 滤膜去除杂菌，分装存于 4℃，并于使用之前加入 10%FBS。

#### 2.2.2 10 $\times$ Tris-SDS 电泳缓冲液

Tris 碱	30g
甘氨酸	144g
SDS	10g

粉末溶解于去离子水，并定容至 1L，存于室温。

#### 2.2.3 2 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液

0.5mol/L Tris·Cl	50mL
SDS 干粉	4g
溴酚蓝	20mg
甘油	20mL

粉末溶于去离子水，并定容至 100mL，使用前加入 1mol/L DTT 至终浓度为 200mol/L。

2.2.4 3%BSA: 称取 3g BSA 粉末溶解于 100mL PBST，现配现用。

#### 2.2.5 PBST

Tris 碱	3g
NaCl	8g
KCl	0.2g
吐温	200 $\mu$ L

粉末溶解于去离子水，并定容至 1L，存于室温。

## 2.2.6 转膜缓冲液

Tris 碱	5.8g
甘氨酸	2.9g
SDS	0.37g
甲醇	200mL

再添加去离子水并定容至 1L, 存于室温。

## 2.2.7 碘化丙啶染色液(PI)

染色缓冲液	6mL
碘化丙啶染色液(20X)	300 $\mu$ L
RNase A(50X)	120 $\mu$ L

将上述液体混合均匀, 4 $^{\circ}$ C 避光储存, 当日使用。

## 2.2.8 免疫荧光相关试剂

4%多聚甲醛: 称取 4g 多聚甲醛干粉, 40 $^{\circ}$ C 水浴溶解于 100mL 去离子水中。

0.1% Triton-100: 吸取 1 $\mu$ L Triton-100 加入到 10mL PBST 中, 充分混匀。

## 2.2.9 银染相关试剂 (现配现用)

固定液: 量筒量取 20mL 无水甲醇和 5mL 冰乙酸, 并用去离子水补充至 50mL。

敏化液: 称取 0.1g 硫代硫酸钠和 3.4g 无水乙酸钠, 溶解于 15mL 无水甲醇, 并用去离子水补充至 50mL。

硝酸银溶液: 称取 0.125g 硝酸银溶于 50mL 去离子水, 避光贮存。

显色液: 称取 1.25g 无水碳酸钠, 再添加 20 $\mu$ L 甲醛溶液, 并加入去离子水补充至 50mL。

终止液: 称取 0.2g 甘氨酸溶解于 50mL 去离子水。

## 2.3 实验方法

## 2.3.1 BmCPV 病毒粒子的制备

按 0.1mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ : 0.1mol/L  $\text{NaHCO}_3$ =9:1 的比例配置 BmCPV 多角体裂解液, 加入 1mL 裂解液到  $2 \times 10^8$  BmCPV 多角体中, 至澄清, 37 $^{\circ}$ C~40 $^{\circ}$ C 放置 10min, 再用 1M HCl 调 pH 至 8.0, 12000rpm 离心 15min 取上清, 用 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤两次, 即为 BmCPV 病毒粒子溶液, 4 $^{\circ}$ C 保存。

## 2.3.2 circRNAs 的体外转录制备

(1) 设计带有 T7 启动子序列的 circRNAs 正向引物及相应的反向引物 (见表

3-1), 提取家蚕中肠 RNA, 并反转录成 cDNA, 进一步以此 cDNA 为模板, 通过 PCR 获得 circRNA\_5655(LOC101742950)的线性 DNA; 以带有 GFP 序列的质粒为模板, 通过 T7-circGFP 引物对 PCR 扩增出含 T7 启动子的线性 GFP DNA, 胶回收后, 作为 T7 体外转录的模板。

表 3-1 circRNAs 的体外转录制备所涉及的引物

Table 3-1 Primers used for circRNAs preparation by transcription *in vitro*

	Forward primers	Reverse primers
T7-circGFP	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> CAAGCTG ACCCTGAAGTTC	GTAGTTGTA <u>CTCCAGCTT</u> GTG
T7-circ5655	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> CGAAACA GCGTGCGAACAA	CGGTAATTATTA <u>ACTGGATTC</u>

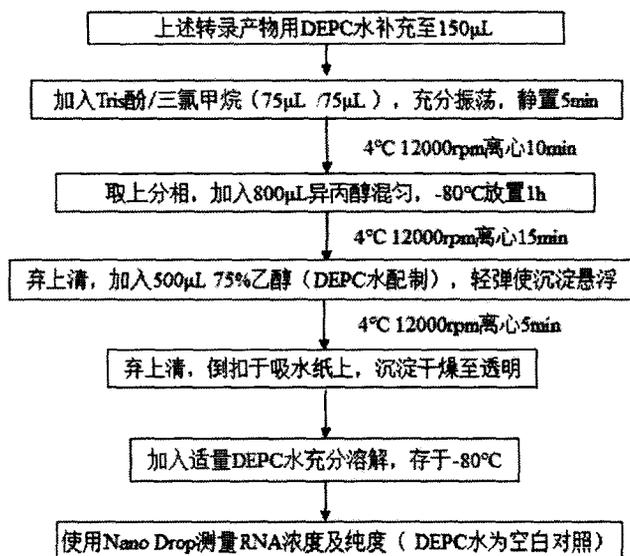
注: 下划线处为 T7 启动子序列

(2) 体外转录 (20 $\mu$ L 反应体系):

10 $\times$ T7 RNA Polymerase Buffer	2 $\mu$ L
DTT (50mM)	2 $\mu$ L
NTP 或 Biotin RNA labeling Mix (10mM)	2 $\mu$ L
DNA Template (50ng-1 $\mu$ g)	3 $\mu$ L
T7 RNA Polymerase (50U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
RNase-free Water	10 $\mu$ L

将上述液体混匀, 37 $^{\circ}$ C 反应 2h。然后加入 2 $\mu$ L DNase I 酶(1U/ $\mu$ L)和 2 $\mu$ L Buffer(+MgCl<sub>2</sub>)在 37 $^{\circ}$ C 消化 15min。

酚/氯仿纯化 RNA:



(3) 体外环化 (20 $\mu$ L 反应体系):

10 $\times$ Reaction Buffer	2 $\mu$ L
ATP (10mM)	2 $\mu$ L
RNA Template	8 $\mu$ L
T4 RNA Ligase I (50U/ $\mu$ L)	2 $\mu$ L
PEG8000 (50%)	1 $\mu$ L
RNase-free Water	5 $\mu$ L

将上述液体混匀, 于 25 $^{\circ}$ C 金属浴反应 3h。之后再通过酚/氯仿纯化 RNA (步骤同上)。

(4) 消化线性 RNA (30 $\mu$ L 反应体系):

RNA (环化产物使终浓度为 20 $\mu$ g)	20 $\mu$ L
RNase R (20U/ $\mu$ L)	0.5 $\mu$ L
10 $\times$ RNase R Buffer	3 $\mu$ L
RNase-free Water	6.5 $\mu$ L

将上述液体混匀, 37 $^{\circ}$ C 金属浴反应 15min, 再反转录、PCR 接头序列并 Sanger 测序验证成环, 再次酚/氯仿纯化 RNA, 存于-80 $^{\circ}$ C 待用。

### 2.3.3 SDS-PAGE

(1) 将玻璃板洗净、晾干、固定 (于水平桌面对齐基座)。

(2) SDS-PAGE 凝胶配制:

	12%分离胶(5mL)	5%浓缩胶(2mL)
	pH8.8, 1M Tris	pH6.8, 1M Tris
蒸馏水	1.0mL	1.4mL
30%Acr-Bis(29:1)	2.0mL	0.33mL
Tris	1.9mL	0.25mL
10% SDS	0.05mL	0.02mL
10%凝胶聚合催化剂	0.05mL	0.02mL
TEMED	0.002mL	0.002mL

先将分离胶注入到玻璃板夹层中，再用蒸馏水封平，室温放置至分离胶凝固，倒出蒸馏水，并用滤纸条吸干残液，再注入浓缩胶，插入上样梳，避免产生气泡。

(3) 室温放置至胶凝固，将胶板放置于电泳槽中，加入  $1\times$ Tris-SDS 电泳缓冲液，拔去上样梳，用微量加样器加入一定量的蛋白 Marker 和蛋白样品（已加入等体积  $2\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液于  $100^{\circ}\text{C}$  煮沸 5min）。

(4) 盖上电泳盖，在蛋白电泳及转移系统上设置程序：先 60V 电泳 30min，再 120V 跑胶至适当位置，待电泳结束，撬开玻璃板拿出凝胶。

#### 2.3.4 Western Blotting

(1) 转膜：将 SDS-PAGE 电泳后的凝胶裁剪成所需大小，同时剪切相应大小的 PVDF 膜于无水甲醇中活化 10min。使用镊子按照“滤纸、凝胶、PVDF 膜、滤纸”的顺序于黑板面（负极），并赶走各层之间的气泡，放入转印槽中，加入转膜缓冲液，四面用冰袋降温，于 100V 电泳 30min（电泳时间由蛋白大小确定）。

(2) 封闭：加入一定体积的 3% BSA 浸没 PVDF 膜， $4^{\circ}\text{C}$  封闭过夜。

(3) 一抗包被：用 3% BSA 按照 1:5000 的比例稀释特异性一抗，将上述封闭的 PVDF 膜于  $37^{\circ}\text{C}$  摇床孵育 2h。

(4) 二抗包被：用 PBST 高转速洗膜 3 遍，每遍 10min，再加入用 3% BSA 稀释的二抗溶液（1:10000）， $37^{\circ}\text{C}$  摇床孵育 1h。

(5) 曝光显色：用 PBST 高转速洗膜 3 次，每次 10min，用 1:1 体积混合的稳定剂和增强剂滴于 PVDF 膜上，用曝光仪成像，使用 Image 软件对曝光条带进行灰度扫描计算。

#### 2.3.5 流式细胞仪检测细胞周期

(1) 细胞同步化：

将  $1-2 \times 10^5$  个 BmN 细胞平铺于六孔板,待细胞密度达到 70-80%且细胞生长状态良好时,弃去旧培养基,无菌  $1 \times \text{PBS}$  “8 字”混匀清洗细胞三次,再加入无血清培养基饥饿处理 48h,弃去旧培养基,加入有血清培养基连续培养 1-2 天,进行后续瞬时转染。

### (2) 细胞样品处理:

弃去旧培养基,  $1 \times \text{PBS}$  清洗细胞三次,添加 1mL 0.25%胰酶消化 5min,待细胞出现间隙,添加等体积有血清培养基终止其消化。轻轻吹下细胞收集于 EP 管中,  $4^\circ\text{C}$  1000rpm 离心 5min,弃上清。加入预冷  $1 \times \text{PBS}$  重悬细胞,  $4^\circ\text{C}$  1000rpm 离心 5min,弃上清(此步骤重复三次)。加入 1mL 预冷 70%乙醇重悬细胞,  $4^\circ\text{C}$  固定 12-24h,再  $4^\circ\text{C}$  1000rpm 离心 5min,弃上清。加入 1mL 预冷  $1 \times \text{PBS}$  重悬细胞,  $4^\circ\text{C}$  1000rpm 离心 5min,弃上清。添加 500 $\mu\text{L}$  PI 混合液重悬细胞,  $37^\circ\text{C}$  避光孵育 30min, 24h 内完成流式检测。

### (3) 流式细胞仪检测分析:

将上述细胞样品加入到流式管内,在激发波长 488nm 处,使用流式细胞仪(Beckman Coulter 公司,型号 FC-500)检测红色荧光及光散射情况,并用分析软件对细胞 DNA 含量和光散射情况进行分析。

#### 2.3.6 流式细胞仪检测细胞凋亡

##### (1) 设门及调补偿:

当流式检测的细胞中含有 GFP 蛋白影响时,需设置 5 组对照。准备不含 GFP 蛋白的细胞;含 GFP 蛋白细胞和不含 GFP 蛋白细胞各一半;不含 GFP 蛋白“半死半活”细胞(即细胞分为两份,一份  $100^\circ\text{C}$  煮沸 5min,再与另一份室温混匀),加入 5 $\mu\text{L}$  Annexin V-PE 单独染色;不含 GFP 蛋白“半死半活”细胞,加入 10 $\mu\text{L}$  7-AAD 单独染色;含 GFP 蛋白细胞和不含 GFP 蛋白细胞各“半死半活”,加入 5 $\mu\text{L}$  Annexin V-PE 及 10 $\mu\text{L}$  7-AAD 染色。

##### (2) 样品处理及流式检测:

将转染后的细胞,弃去旧培养基,  $1 \times \text{PBS}$  清洗细胞三次,添加 1mL 不含 EDTA 胰酶消化 5min,待细胞出现间隙,添加等体积有血清培养基终止其消化。收集细胞于 EP 管中,  $4^\circ\text{C}$  1000rpm 离心 5min,弃上清。用去离子水按照 1:4 的比例稀释结合缓冲液,加入预冷  $1 \times \text{PBS}$  重悬细胞,  $4^\circ\text{C}$  1000rpm 离心 5min,弃上清(此步

骤重复两次)。再加入 250 $\mu$ L 结合缓冲液以重悬细胞, 并且调整细胞密度为  $1 \times 10^6$  个/mL。吸取 100 $\mu$ L 细胞悬液, 加入 5 $\mu$ L Annexin V-PE 及 10 $\mu$ L 7-AAD, 混匀后于 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 15min, 最后添加 400 $\mu$ L 预冷  $1 \times$ PBS 重悬细胞, 24h 内完成流式检测。

### 2.3.7 细胞免疫荧光

(1) 用镊子向 24 孔板中放入细胞爬片, 将  $2 \times 10^5$  个细胞平铺于爬片上, 培养至细胞密度为 70-80%且生长状态良好, 进行转染。

(2) 弃旧培养基,  $1 \times$ PBS 洗细胞两次, 添加 500 $\mu$ L 4%多聚甲醛固定 15min (摇床慢摇)。

(3) 加入 PBST 洗 3 次每次 5min, 再添加 500 $\mu$ L 0.1% Triton-100, 摇床慢速孵育 10min。

(4) 弃通透液, 加入 PBST 洗 3 次每次 5min, 再加入 5% BSA 浸没爬片, 室温封闭 2h。

(5) 弃封闭液, 加入用 5% BSA 稀释的特异性一抗 (1:1000), 室温孵育 2h。

(6) 弃一抗, PBST 洗 3 次每次 5min, 再加入用 5% BSA 稀释的 Cy3 标记荧光二抗 (1:200), 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1h。

(7) 弃二抗, PBST 洗 3 次每次 5min, 再加入 100 $\mu$ L DAPI 溶液 (1:1000), 避光孵育 10min。

(8) 弃 DAPI 溶液, PBST 洗 3 次每次 5min。取出爬片, 细胞面向上于室温避光晾干, 滴加 10 $\mu$ L 防荧光淬灭封片剂于载玻片上, 再将细胞面朝下轻轻按在载玻片上 (防止气泡的产生)。

(9) 避光于蔡司激光扫描共聚焦显微镜 (型号 LSM-800) 下拍照。

### 2.3.8 双荧光素酶报告系统

通过分析家蚕 circRNAs 的高通量测序数据可知, circRNA\_5655 能够吸附 bmo-miR-3391-5p, 调控下游靶基因家蚕神经肽受体 A35 (NM\_001134279.1) 和家蚕组蛋白去乙酰化酶 Rpd3 (XM\_004931383.2) 的表达。

(1) circRNA\_5655 与 bmo-miR-3391-5p 结合位点预测

RNAhybrid ([https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid?id=rnahybrid\\_view\\_submission](https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid?id=rnahybrid_view_submission)) 是一种基于 miRNA-target 碱基互补配对匹配度和能量稳定性来预测

miRNA 结合位点的软件, 利用该软件将 circRNA\_5655 与 bmo-miR-3391-5p 进行序列比对, 结果见图 3-1。

```

Target: XM_012694348.1
length: 563
miRNA: bmo-miR-3391-5p
length: 27

mfe: -27.3 kcal/mol
p-value: undefined

Position: 303
target 5' G           A   ACAGGACAUCGC   AAGU   A 3'
           GUGAAGGU C GGAU           GCCA   CGACC
           UACUUGCA G UUUA           UGGU   GCUUG
miRNA 3' GG           U C                               A 5'
  
```

图 3-1 circRNA\_5655 与 bmo-miR-3391-5p 结合位点预测

Fig 3-1 Binding site of circRNA\_5655 and bmo-miR-3391-5p

### (2) bmo-miR-3391-5p 与靶 mRNA 结合位点预测

使用 RNAhybrid 软件将 miRNA 与其下游靶基因家蚕神经肽受体 A35 (NGR-A35)和家蚕组蛋白去乙酰化酶 Rpd3 的 3'UTR 进行序列比对, 结果见图 3-2。

<p><b>A</b></p> <pre> <b>Target:</b> NM_001134279.1 length: 245 <b>miRNA:</b> bmo-miR-3391-5p length: 27  mfe: -21.8 kcal/mol p-value: undefined  <b>Position:</b> 69 target 5' C   U   A   GC   UUGU G   C 3'            UCA UGAGG GUG UGG   C GCGGCU            GGU ACUUC CAU GCU   G UGCUGG miRNA 3'           UUUAU G   A 5'   </pre>	<p><b>B</b></p> <pre> <b>Target:</b> XM_004931383.2 length: 2097 <b>miRNA:</b> bmo-miR-3391-5p length: 27  mfe: -31.1 kcal/mol p-value: undefined  <b>Position:</b> 1882 target 5' U   U   AAU   C                               C 3'            UCGUG GGG   CGAA   CCACGACC            GGUAC UCC   GCUU   GGUGCUGG miRNA 3'           U   AU   UAU   A 5'   </pre>
---	---

图 3-2 bmo-miR-3391-5p 与下游靶基因结合位点预测

A: bmo-miR-3391-5p 与家蚕神经肽受体 A35 结合位点; B: bmo-miR-3391-5p 与家蚕组蛋白去乙酰化酶 Rpd3 结合位点

Fig 3-2 Binding site of bmo-miR-3391-5p and downstream target gene

A: Binding site of bmo-miR-3391-5p and *Bombyx mori* neuropeptide receptor A35; B: Binding site of bmo-miR-3391-5p and *Bombyx mori* histone deacetylase Rpd3

## (3) 构建萤火虫荧光素酶表达载体

设计特异性引物(表 3-2),以 pOtu-Luc-mtX 载体为模板(本实验室朱敏构建,即在 pGL3 载体上插入了家蚕卵巢瘤基因启动子 *potu* 驱动的 *Luc* 基因表达盒),利用 PCR 技术在 *Luc* 基因的 3' 末端加上与 *bmo-miR-3391-5p* 互作的靶基因 3'UTR 序列,分别获得 *Luc-mut* (突变对照)、*Luc-A35* 和 *Luc-Rpd3* 目的片段,胶回收后,克隆进 pMD19-T(Simple)载体,得到 pMD19-*Luc* 载体。再用 *SmaI* 和 *XbaI* 双酶切,并克隆进同样双酶切的 pOtu-*Luc-mtX* 载体,获得 pOtu-*Luc-mut*、pOtu-*Luc-A35* 和 pOtu-*Luc-Rpd3* 载体。最后这些载体经 *SmaI* 和 *XbaI* 双酶切可切出对应的目的片段,表明载体已按设计要求构建。

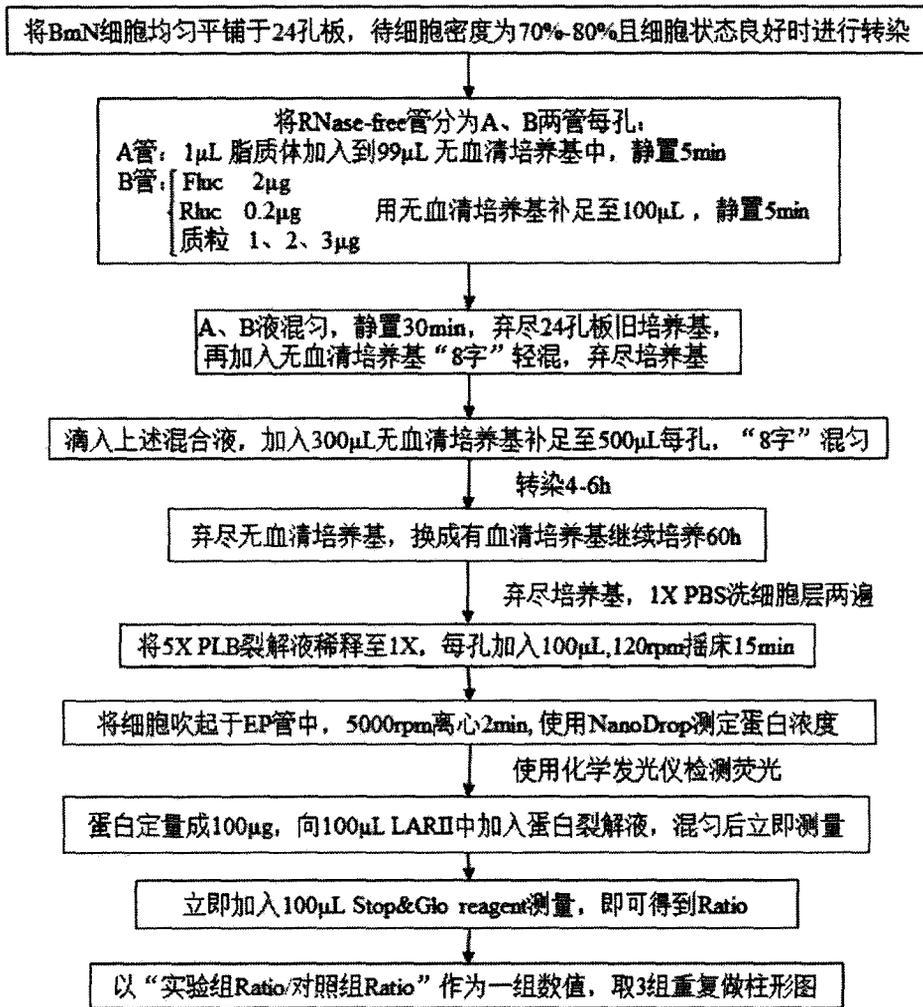
表 3-2 荧光素酶报告载体构建所涉及的 PCR 引物序列

Table 3-2 PCR primer sequences for luciferase reporter vector construction

引物名称	引物序列(5'-3')	酶切位点
Luc-mut-1	<u>CCCGGGC</u> CATGGAAGACGCCAAAAAC	<i>SmaI</i>
Luc-mut-2	<u>TCTAGA</u> <u>GGTCTTGTCTGCCTACCCCTAG</u> TTACACGGCGATCTT TCCGC	<i>XbaI</i>
Luc-A35-1	<u>CCCGGGC</u> CATGGAAGACGCCAAAAAC	<i>SmaI</i>
Luc-A35-2	<u>TCTAGA</u> <u>GAGCCGCCGACAACCAGCCACTCCTCAATGAG</u> TTACA CGGCGATCTTCCGC	<i>XbaI</i>
Luc-Rpd3-1	<u>CCCGGGC</u> CATGGAAGACGCCAAAAAC	<i>SmaI</i>
Luc-Rpd3-2	<u>TCTAGA</u> <u>GGGTCGTGGGTTTCGATTCACACGAA</u> TTACACGGCG ATCTTCCGC	<i>XbaI</i>

注:下划线表示酶切位点;方框处为 *bmo-miR-3391-5p* 靶位点

## (4) 双荧光素酶报告系统试验按如下流程进行(设置 3 组重复)



### 2.3.9 circRNA-miRNA pull down

首先配制多核糖体裂解液：

Tris HCl	0.1576g
KCl	0.3727g
MgCl <sub>2</sub>	0.0508g
NP-40	250μL

用 DEPC 水定容至 50mL，调 pH 7.5。

再配制 TENT Buffer：

Tris HCl	0.0788g
NaCl	0.7305g
EDTA	0.0146g
TritonX-100	250μL

用 DEPC 水定容至 50mL, 调 pH 8.0。

首先设计靶向 circRNA\_5655 反向剪接位点的生物素标记探针 (见下表), 序列 5'端添加生物素标记, 送于上海生工生物工程有限公司合成。

表 3-3 靶向 circRNA\_5655 反向剪接位点的生物素标记探针

Table 3-3 Biotin-labeled probe for circRNA\_5655 back splicing junction

circRNA	Probe sequence	Biotin label site
circRNA_5655	GTTAATAATTGCCGGCGAAACAGCGTGC	5'biotin

再按如下步骤进行实验:

(1) 1×PBS 清洗细胞层, 加入 1mL 多核糖体裂解液和 10μL PMSF 混匀, 冰上放 10min, 吹下细胞于 RNase-free 管, 再 4℃ 12000rpm 离心 15min, 取上清。

(2) 吸取上述 150μL 裂解液, 加入 20μL 生物素标记探针 (浓度为 200pmol) 和 100μL TENT Buffer, 于 DNA 混合仪在室温下孵育 1h。

(3) 用 100μL TENT Buffer 清洗 50μL 链霉素琼脂糖树脂, 离心取沉淀。

(4) 将上述裂解液与探针的混合物, 加入到链霉素琼脂糖树脂中混匀, 于 DNA 混合仪在 25℃ 孵育 30min。

(5) 再用 100μL TENT Buffer 清洗链霉素琼脂糖树脂 3 次, 每次 4℃ 4000rpm 离心 5min, 弃上清。

(6) 用 RNAiso Plus 等试剂提取 Pull Down 下来的 RNA (步骤同第二章)。

(7) 根据预测的与 circRNA\_5655 互作的 bmo-miR-3391-5p 序列设计反转录引物(RT-primer) (下划线处为通用茎环结构), 和 PCR 引物序列如下 (表 3-4):

表 3-4 circRNA\_5655-miRNA 的 PCR 引物

Table 3-4 PCR primer for circRNA\_5655-miRNA

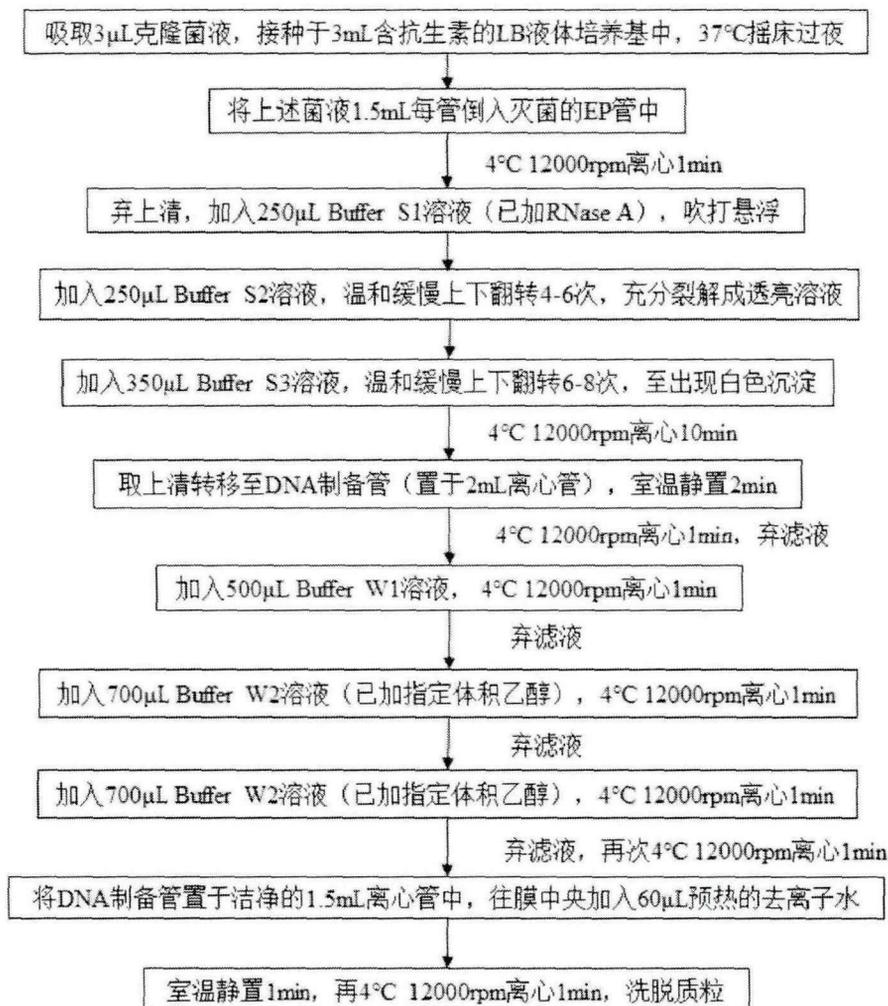
miRNA	RT- primer	Forward primer	Reverse primer
bmo-miR-3391-5p	<u>GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGI</u> <u>ATTCGCACTGGATACGACCCATGAAG</u>	GAGGTCGTGGTATT TCGTACC	GCAGGGTCCGAGG TATTC

将提取的 RNA 进行反转录, 步骤同第二章, 其中使用 miRNA-RT 引物代替随机引物。

(8) 使用设计的 miRNA 上下游引物, 以上述反转录产物为模板进行 PCR, 胶回收目的条带并连接 T 载体进行 Sanger 测序验证 (测序比对见附录七)。

### 2.3.10 抽提质粒

质粒 DNA 的快速抽提按以下流程进行。



### 2.3.11 双酶切

按照如下 20μL 反应体系反应：

质粒样品	5μL
10× Buffer	2μL
限制性核酸内切酶 1	1μL
限制性核酸内切酶 2	1μL
ddH <sub>2</sub> O	11μL

将上述液体混匀，37℃快酶酶切 30min 或者 37℃慢酶酶切 2h30min。再将产物经过琼脂糖凝胶电泳分离，胶回收目的条带，连接转化，挑斑摇菌，抽提质粒，再次双酶切、凝胶电泳鉴定。

## 2.3.12 pIZT-LcR 及 pIZT-LcR-5655 成环载体转染

(1) 将  $1-2 \times 10^5$  个 BmN 细胞平铺于六孔板内，待细胞密度至 70%-80% 且生长状态良好时进行瞬时转染。

(2) 不同剂量的质粒(1 $\mu$ g、2 $\mu$ g、3 $\mu$ g)分别用无血清昆虫培养基补足到 100 $\mu$ L，2 $\mu$ L 脂质体与 98 $\mu$ L 无血清培养基混合，将上述液体混合并静置 30min。

(3) 将 200 $\mu$ L 混合液滴加至六孔板，用无血清培养基补足至 1mL，“8”字混匀后于 26 $^{\circ}$ C 细胞培养箱饥饿 4-6h，再更换含血清培养基继续培养 48h 后收集细胞。

## 2.3.13 circRNA\_5655 对宿主免疫、凋亡相关基因表达的影响

根据家蚕免疫和凋亡相关通路的基因序列设计定量 PCR 引物，选择在病毒感染情况下仍表达稳定的家蚕翻译起始因子 TIF-4A 作为内参<sup>[34]</sup>，各引物序列如表 3-5 所示。

表 3-5 荧光定量 PCR 引物序列

Table 3-5 Primers for Real-time PCR

目的基因	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
<i>BmSurvivin-1</i> (XM_012688679.2)	GGAGACGACGGGTCGCCACTC	CGGCTCGTTGAAGTACGGCTC
<i>BmP53</i> (KC243147.1)	GAGTCGAGAGATGCATCCAGC	CCGCAGTACTGCACGTCGTTG
<i>BmApa</i> (XM_021353580.1)	TCGAGAGTGCAGGCGTGCTCG	CGTATGACGTACGTGATGTTT
<i>BmSPZ</i> (NM_001114594.1)	CAGGATTCGCCTCACAGTCAC	CAGTTCGGGATGCTTCCTCGAT
<i>BmSTAT</i> (NM_001163916.1)	GAGCGTTATGGACGAGAAGC	CCTGGTTGCCGTGGACTATG
<i>TIF-4A</i> (XR_002431283.1)	GAATGGACCCTGGGACACTT	CTGACTGGGCTTGAGCGATA

## 2.3.14 BmCPV 病毒感染对 circRNA 表达模式的影响及 circRNAs 对其亲本基因表达的调控

为研究家蚕 circRNA\_5655 在不同组织、不同发育阶段的表达模式和 BmCPV 感染不同时相表达水平的变化，我们设计特异性引物进行实时定量 PCR 验证。并设计了 circRNA\_5655 的亲本基因 *BmHKMT3*(LOC101742950)定量 PCR 引物，验证过表达 circRNA 对其表达调控的影响，所涉及引物如表 3-6 所示。

表 3-6 qPCR 验证所用引物序列

Table 3-6 Primers for qPCR

引物名称	上游引物序列(5'to3')	下游引物序列(5'to3')
circRNA_5655	GCCAAACGCGAGACTCACTA	TTCGCACGCTGTTTCGCCGG
BmHKMTs	TTGCACGCCGGACAGAGCCT	CCTGCAGCTCCAGGTAGAGC
TIF-4A	GAATGGACCCTGGGACACTT	CTGACTGGGCTTGAGCGATA

## 2.3.15 circRNA\_5655 对 BmCPV 增殖复制的影响

为研究家蚕 circRNA\_5655 与 BmCPV 的互作,设计了 BmCPV S1 片段和 BmCPV S7 片段的特异性定量引物(表 3-7),调查过表达 circRNA\_5655 对病毒增殖复制的影响。

表 3-7 评估 BmCPV 增殖的定量引物

Table 3-7 qPCR Primers for determination of BmCPV replication

H 的基因 (GeneBank 登录号)	上游引物序列(5'to3')	下游引物序列(5'to3')
BmCPV S1(GU323605.1)	GGTCTCGACGTGAATACCGA	TCGTCTGCTTCACTAGCACG
BmCPV S7(GQ150538.1)	CAGGCAGAACCGCAACTATC	GGTGATGCTCGTTCGTGGTGT
TIF-4A	GAATGGACCCTGGGACACTT	CTGACTGGGCTTGAGCGATA

## 2.3.16 circRNA-protein pull down

(1) 生物素标记的 circRNA 的体外制备(步骤同前)。

(2) 1×PBS 清洗细胞( $2 \times 10^5$ )两遍,弃尽液体,加入 500μL Lysis Buffer、5μL PMSF 及 5μL 磷酸酶抑制剂。使用细胞刮子收集细胞于 RNase-free 管中,置于 DNA 混合仪上 4℃裂解 2h,再 4℃ 12000rpm 离心 10min,留存蛋白上清。

(3) 生物素标记的 circRNA 与链霉亲和素磁珠相结合:

① 吸取 50μL 磁珠于 RNase-free 管中,放置于磁柱上,待沉淀吸附于管壁上,弃上清。

② 添加 100μL 20mM Tris-HCl(pH7.5)混匀磁珠,再置于磁柱上弃上清(按此步骤清洗磁珠两次)。

③ 加入 50μL 1×RNA Capture Buffer 混匀重悬磁珠,再添加一定体积的生物素标记的 circRNA(每 50μL 磁珠加入 50-100pmol circRNA),置于 DNA 混合仪上超慢速室温孵育 15-30min。

(4) 生物素标记的 circRNA 与 RBPs 相结合:

① 将上述磁珠放置于磁柱上，待沉淀吸附于管壁上，弃上清。

② 吸取 100 $\mu$ L 20mM Tris-HCl(pH7.5)混匀磁珠，再置于磁柱上弃上清（按此步骤清洗磁珠两次）。

③ 将 10 $\times$  Protein-RNA Binding Buffer 用 RNase-free Water 稀释至 1 $\times$ ，加入 100 $\mu$ L 此 1 $\times$  Buffer 重悬磁珠，置于磁柱上弃上清。

④ 加入如下 100 $\mu$ L 反应体系：

10 $\times$ Protein-RNA Binding Buffer	10 $\mu$ L
Glycerol, 50% m	30 $\mu$ L
蛋白(浓度>2 mg/mL)	40 $\mu$ L

使用 RNase-free Water 补足到 100 $\mu$ L，混匀后加入到磁珠中，于 DNA 混合仪上超慢速 4 $^{\circ}$ C 孵育 30-60min。

(5) 洗脱 RBPs:

① 将磁珠置于磁柱上弃上清，加入 100 $\mu$ L 1 $\times$  Wash Buffer 重悬磁珠，于磁柱上弃上清（按此步骤清洗磁珠三次）。

② 加入 50 $\mu$ L Biotin Elution Buffer 重悬磁珠，于 DNA 混合仪上超慢速 37 $^{\circ}$ C 孵育 15-30min。

③ 置于磁柱上取上清于 RNase-free 管中，再加入等体积蛋白上样缓冲液于 100 $^{\circ}$ C 煮沸 5min。

(6) SDS-PAGE 凝胶电泳（步骤同前）。

### 2.3.17 银染与质谱鉴定

(1) 固定：将上述电泳后凝胶浸没于固定液中，摇床孵育大于 30min。

(2) 敏化：弃固定液，将凝胶浸没于敏化液中，摇床孵育 30min。

(3) 漂洗：弃敏化液，用去离子水浸没清洗凝胶，洗三遍每遍 5min。

(4) 染色：加入一定体积的硝酸银溶液浸没凝胶，避光摇床染色 3min。

(5) 漂洗：弃染色液，用去离子水浸没清洗凝胶，洗两遍每遍 5min。

(6) 显色：加入一定体积的显色液浸没凝胶，时刻观察颜色变化，待出现清晰蛋白条带时，立即取出凝胶。

(7) 终止：加入一定体积的终止液浸没凝胶，摇床孵育 10min。

(8) 漂洗：弃终止液，用去离子水浸没清洗凝胶，洗三遍每遍 5min。

(9) 质谱鉴定：于明亮灯光下割取差异条带，并将这些差异条带送到上海中科新生命生物科技有限公司进行质谱鉴定。

### 3 结果与分析

#### 3.1 circRNA\_5655 的一般特性

由家蚕 CircSeq 结果可知，circRNA\_5655 是由与经典 GT/AG 剪接相结合的反向剪接形成的多外显子 circRNA，相比于正常对照，在 BmCPV 感染的中肠中其表达水平显著上调 700 多倍。

家蚕 circRNA\_5655 的全长序列为 563bp，其亲本基因为家蚕组蛋白-赖氨酸 N-甲基转移酶 (*Bombyx mori* histone-lysine N-methyltransferase eggless，LOC101742950)，简称为 *BmHKMTs* 基因。利用 NCBI 上 Splign 在线软件 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/splign/splign.cgi?textpage=online&level=form>) 分析 circRNA\_5655 的形成方式，可知 circRNA\_5655 是由其来源基因上第 9 位到第 13 位的五个外显子环化而成 (见图 3-3)。

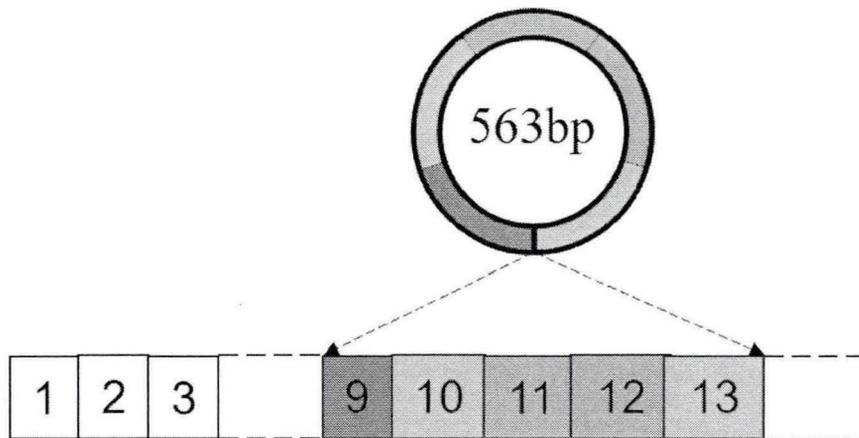


图 3-3 circRNA\_5655 的组成

Fig 3-3 The composition of circRNA\_5655

使用发散性引物来验证试验样品的 circRNA\_5655，并通过 Sanger 测序验证(图 3-4)，实验证明测序结果与预测结果一致。

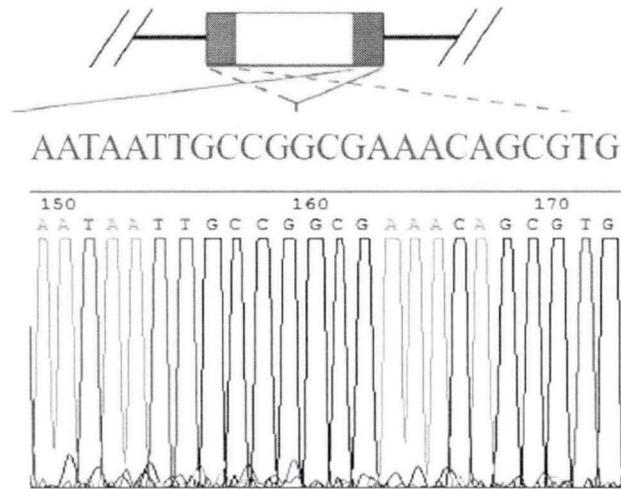


图 3-4 Sanger 测序验证 circRNA\_5655 表达

Fig 3-4 Validation of circRNA\_5655 expression by Sanger sequencing

### 3.2 circRNA\_5655 的表达模式及对 BmCPV 的感染应答

荧光定量 PCR 检测 circRNA\_5655 在不同发育阶段的家蚕中肠中的相对表达丰度，结果显示，家蚕 circRNA\_5655 在 5 龄 3 天中肠中的相对表达丰度最高，与在 3 龄第 3 天中肠中的表达水平相比上调了 21 倍（图 3-5）。

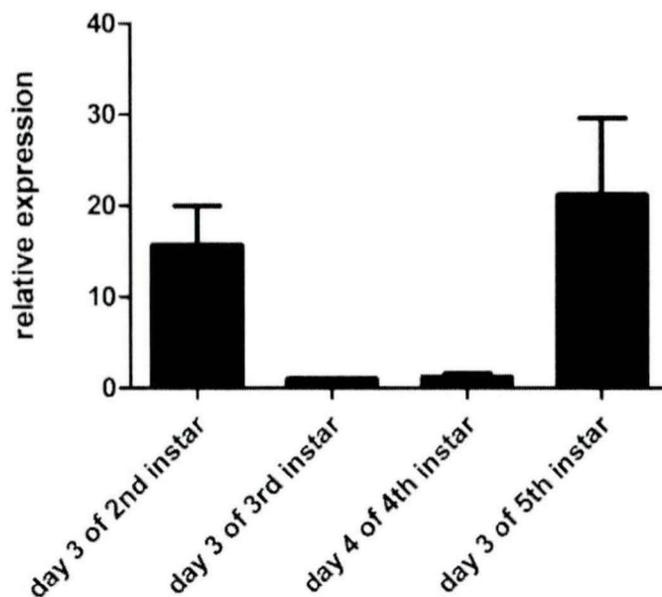


图 3-5 不同发育阶段家蚕中肠中 circRNA\_5655 的相对表达丰度

Fig 3-5 The relative abundance of circRNA\_5655 in midgut in diverse developmental stage

取五龄 3 天家蚕的性腺、丝腺、马氏管、头、脂肪体、中肠、蚕血和表皮，提取 RNA 后，荧光定量 PCR 检测 circRNA\_5655 的相对表达丰度。结果显示，circRNA\_5655 在头部相对表达丰度最高，其次是马氏管，在皮肤中表达量最低（图 3-6）。

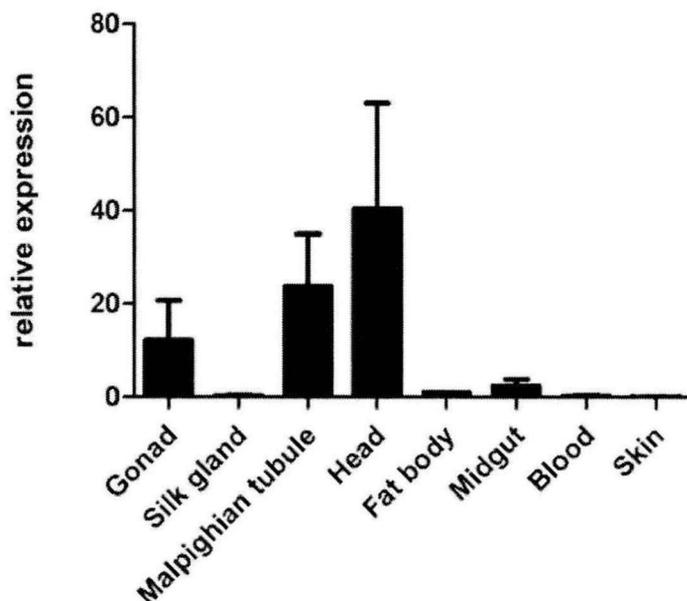


图 3-6 家蚕五龄三天不同组织中 circRNA\_5655 的相对表达丰度

Fig 3-6 The relative abundance of circRNA\_5655 in diverse tissues in 3<sup>rd</sup> day of 5<sup>th</sup> instar

三龄起蚕感染 BmCPV，取感染后不同时相（1-12 天）的中肠及对应的正常中肠，提取总 RNA，并用随机引物反转录成 cDNA，通过 RT-qPCR 检测 circRNA\_5655 表达量的变化情况。其中第一天为三龄起蚕，第五天四龄蚕眠起，第十天五龄蚕眠起。结果显示（图 3-7），三龄起蚕 circRNA\_5655 的表达水平很高，尔后逐渐下降，至四龄蚕眠起时又开始升高，随后呈现下降趋势，五龄三天家蚕中肠中 circRNA\_5655 的表达水平最高。相比于正常中肠对照，BmCPV 感染后 circRNA\_5655 的表达水平均呈现出显著上调，说明 BmCPV 感染能够驱使家蚕 circRNA\_5655 的表达水平应激上调。

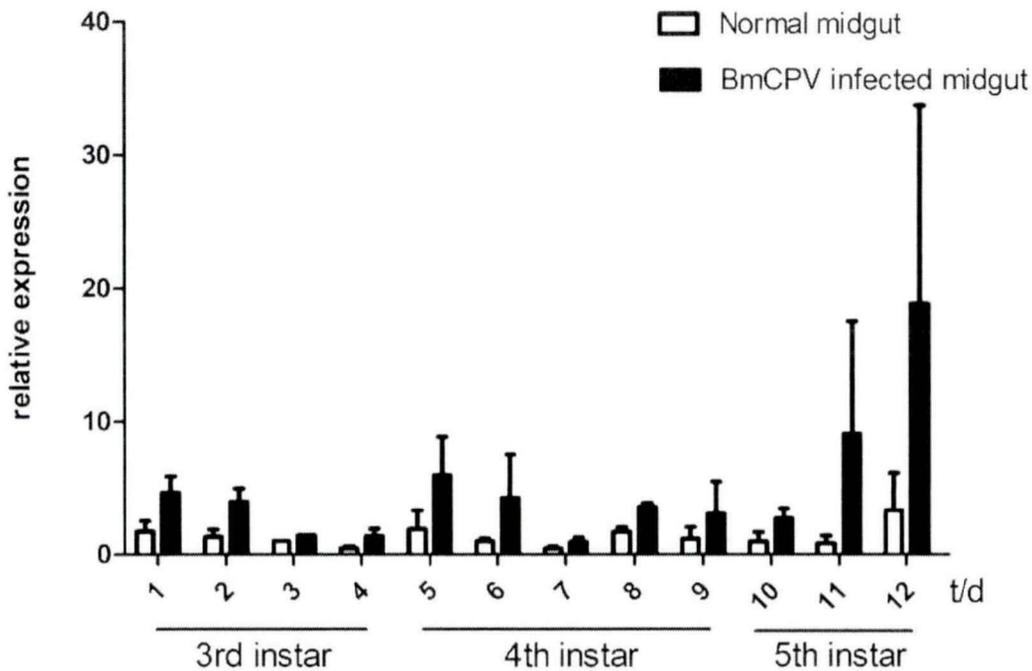


图 3-7 中肠 circRNA\_5655 表达对 BmCPV 的感染应答

Fig 3-7 Response of expression of circRNA\_5655 in midgut to BmCPV infection

### 3.3 体外转录法构建 circRNAs 及 circRNA\_5655 表达载体的构建

首先利用 PCR 获得带有 T7 启动子序列的家蚕 circRNA\_5655 及 circRNA\_GFP (对照) 的线性 DNA, 以胶回收 PCR 产物 (见图 3-8) 作为模板, 使用 T7 RNA 聚合酶体外转录成 RNA, DNaseI 消化去除质粒 DNA 后, 在 RNA 连接酶的作用下环化成 circRNA, 通过 RNase R 酶消化去除线性 RNA 后, 获 circRNA。为了确认按设计要求成功制备了 circRNA, 通过发散引物 PCR 扩增 junction site, 然后克隆进 T-载体进行 Sanger 测序, 结果显示, circRNA 的 junction site 与理论序列完全一致 (测序结果见附录七), 说明通过体外转录法成功构建了 circRNAs。

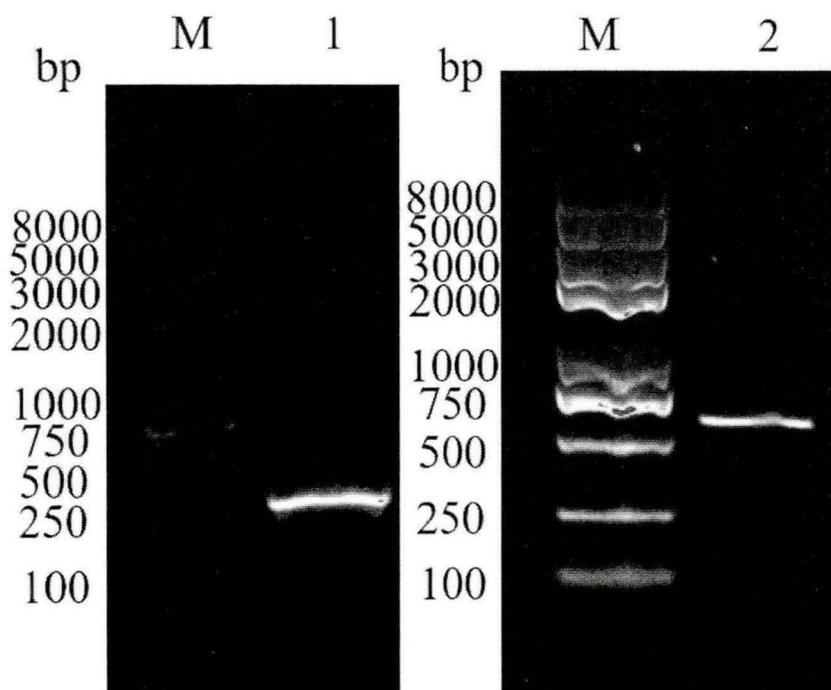


图 3-8 带有 T7 启动子序列的 circRNAs (T7-circRNA)线性分子的制备

M: DNA marker; 1: T7-circGFP PCR 产物; 2: T7-circ5655 PCR 产物

Fig 3-8 Linear molecules of circRNAs (T7-circRNA) with T7 promoter sequence

M: DNA marker; 1: PCR product of T7-circGFP; 2: PCR product of T7-circ5655

已有研究表明果蝇 *laccase2* 基因的侧翼内含子序列能够在果蝇和人体细胞中有效驱动多种外显子的环化<sup>[35]</sup>。根据此研究结果，我们设计了家蚕细胞内的 circRNA 的表达载体 pIZT-LcR 及 circRNA\_5655 表达载体 pIZT-LcR-5655 的构建方案（图 3-9），由苏州泓迅生物技术有限公司完成构建（构建方案见附录三）。

将不同剂量的体内成环载体 pIZT-LcR-5655 转染进 BmN 细胞，48h 后收集细胞，并通过 RT-qPCR 检测细胞中 circRNA\_5655 的表达水平。结果如图 3-10 所示，不同剂量(1 $\mu$ g、2 $\mu$ g、3 $\mu$ g)的 pIZT-LcR-5655 载体均能在 BmN 细胞中成功表达出 circRNA\_5655，且相比于对照（转染相应剂量的 pIZT-LcR 载体），circRNA\_5655 的表达水平呈现出剂量依赖性显著上调，并当转染最高剂量 3 $\mu$ g 时，circRNA\_5655 的表达水平上调了 1600 倍左右。再将此 qPCR 产物胶回收后，克隆进 T 载体进行 Sanger 测序验证，结果显示所测序列与 circRNA\_5655 接头序列完全匹配，说明 pIZT-LcR-5655 载体确实能在 BmN 细胞内有效驱动 RNA 环化（测序结果见附录七）。

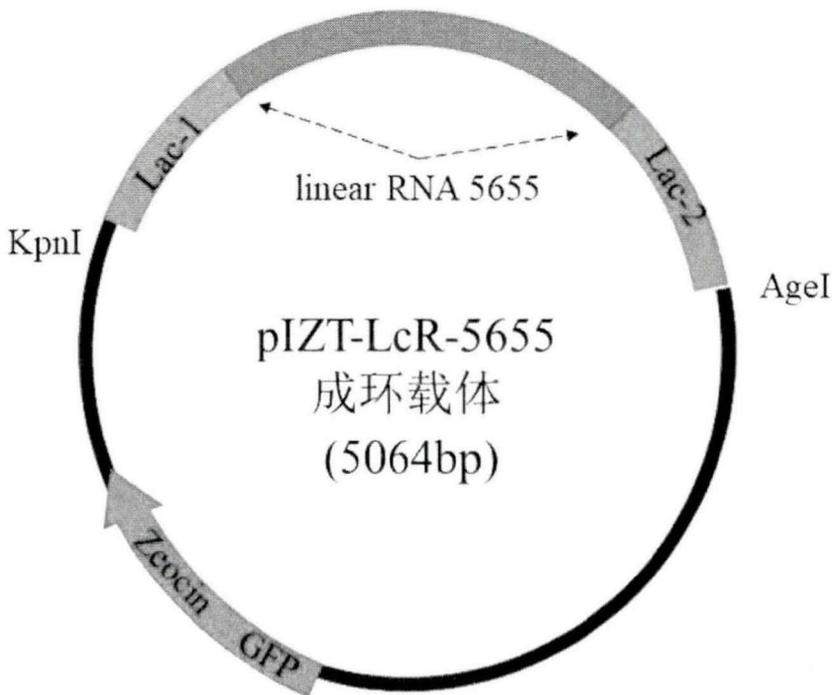


图 3-9 circRNA-5655 表达载体 pIZT-LcR-5655 载体的构建

Lac-1: 果蝇 laccase2 内含子 1 的 128-548nt 区域; Lac-2: 果蝇 laccase2 内含子 2 的 1169-1707nt 区域; linear RNA 5655 为 circRNA-5655 的线性 DNA 片段

Fig 3-9 The construction of circRNA-5655 expression vector pIZT-LcR-5655

Lac-1: The region 128-548nt of *Drosophila* laccase2 intron 1; Lac-2: The region 1169-1707nt of *Drosophila* laccase2 intron 2; linear RNA 5655: Linear DNA fragment of circRNA-5655

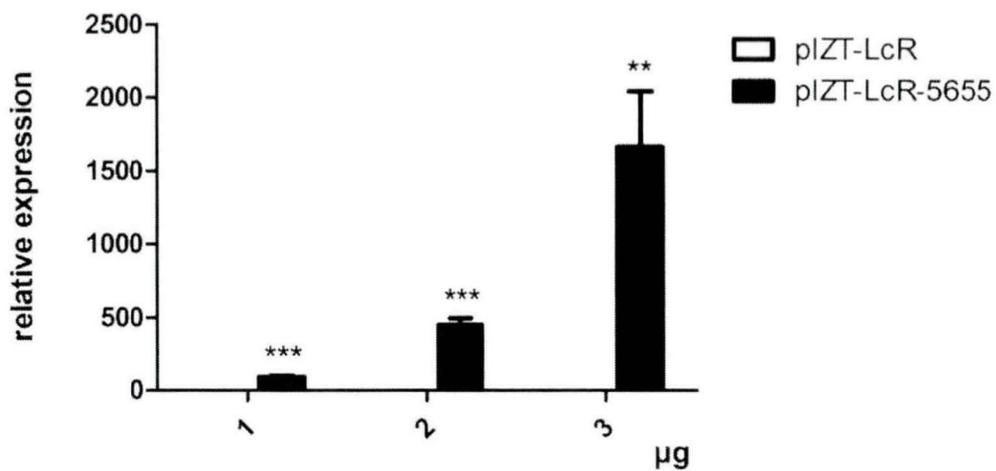


图 3-10 pIZT-LcR-5655 在 BmN 细胞中表达 circRNA\_5655 (\*\*\*) $p < 0.001$ , (\*\*) $p < 0.01$ )

Fig 3-10 pIZT-LcR-5655 overexpression vector expresses circRNA\_5655 in BmN cells  
( $***p<0.001$ ,  $**p<0.01$ )

### 3.4 circRNA\_5655 对其亲本基因表达的影响

有研究报道指出, circRNA 可反馈调控其亲本基因线型转录本的表达<sup>[36,37]</sup>。为探讨 circRNA\_5655 对其亲本基因表达调控的影响, 我们用 1mL 无血清培养基将 pIZT-LcR 和 pIZT-LcR-5655 按不同剂量(1 $\mu$ g、2 $\mu$ g、3 $\mu$ g)分别转染  $2\times 10^8$  个 BmN 细胞, 48h 后收集细胞, qPCR 定量检测其亲本基因的转录情况。结果如图 3-11 所示, 过表达 circRNA\_5655 后, 其亲本基因的相对表达水平都呈现出显著下调, 且当细胞中存在高水平的 circRNA\_5655 时, 其亲本基因的表达量相比于对照下调了 3 倍左右, 可见过表达 circRNA\_5655 对其亲本基因的转录起到明显的抑制作用。

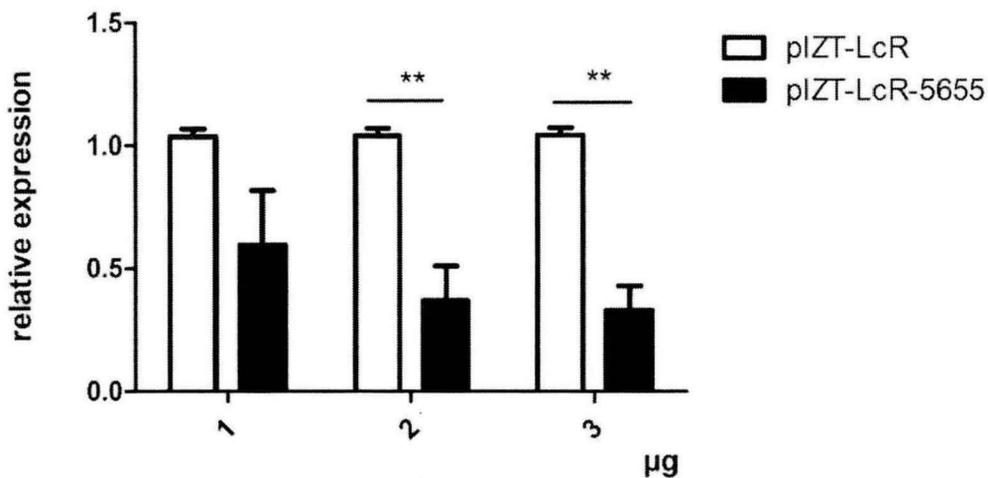


图 3-11 过表达 circRNA\_5655 对其亲本基因表达的抑制 ( $**p<0.01$ )

Fig 3-11 Regulation of host gene expression by overexpressing circRNA\_5655  
( $**p<0.01$ )

已知 circRNA\_5655 亲本基因为 *Bombyx mori* histone-lysine N-methyltransferase eggless (LOC101742950), 这种组蛋白甲基转移酶能够特异性地使家蚕卵巢中组蛋白 H3 的第 9 位赖氨酸发生三甲基化, 从而影响基因组中异染色质的结构和一些生长相关基因的表达<sup>[38]</sup>。

不同剂量(1 $\mu$ g、2 $\mu$ g、3 $\mu$ g)的 pIZT-LcR 和 pIZT-LcR-5655 载体转染进  $2\times 10^8$  个 BmN 细胞, 48h 后提取细胞总蛋白, 用组蛋白 H3K9me3 多克隆兔抗作为特异性一抗, Western Blotting 检测家蚕组蛋白甲基化程度。结果显示, 在 BmN 细胞系中可以检测到 15kDa 大小的 H3 组蛋白第 9 个赖氨酸三甲基化(H3K9me3)蛋白 (图

3-12A), 且从灰度扫描结果 (图 3-12B) 可以看出, 转染 1 $\mu$ g、2 $\mu$ g、3 $\mu$ g 的 pIZT-LcR-5655 载体后, 细胞中 H3K9me3 蛋白的水平显著上调, 分别为对照的 1 倍、1.5 倍及 2.0 倍。表明过表达 circRNA\_5655 促进了组蛋白 H3K9 发生三甲基化。

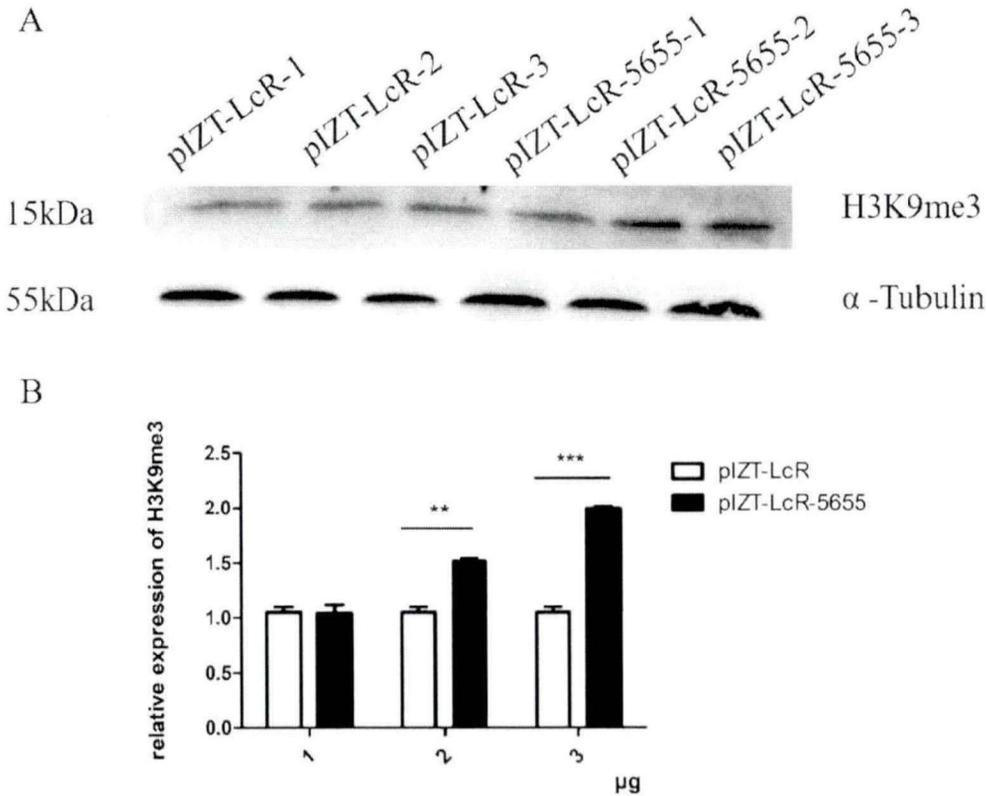


图 3-12 过表达 pIZT-LcR-5655 对组蛋白甲基化的影响 (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )

A: Western Blotting 检测过表达 pIZT-LcR-5655 对组蛋白甲基化的影响 (pIZT-LcR-1、-2、-3 分别为转染 1、2、3 $\mu$ g 的 pIZT-LcR 载体 48h 后收细胞蛋白, pIZT-LcR-5655-1、-2、-3 分别为转染 1、2、3 $\mu$ g 的 pIZT-LcR-5655 载体 48h 后收细胞蛋白, 组蛋白甲基化一抗为 H3K9me3 兔抗, 内参一抗为  $\alpha$ -Tubulin 鼠抗, 二抗分别为 HRP 标记山羊抗兔 IgG 和 HRP 标记山羊抗鼠 IgG); B: Western Blotting 条带灰度扫描结果

Fig 3-12 Effect of overexpressing pIZT-LcR-5655 on histone methylation (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )

A: Effect of overexpressing pIZT-LcR-5655 on histone methylation with Western blotting test (pIZT-LcR-1、-2、-3: cells transfected by 1、2、3 $\mu$ g pIZT-LcR and collected protein after 48h, pIZT-LcR-5655-1、-2、-3: cells transfected by 1、2、3 $\mu$ g pIZT-LcR-5655

and collected protein after 48h, H3K9me3 Rabbit Polyclonal Antibody and alpha Tubulin Mouse McAb are the primary antibody, the second antibody are HRP-labeled Goat Anti-Rabbit IgG and HRP-labeled Goat Anti-mouse IgG ); B: Grayscale of Western blotting image

### 3.5 circRNA\_5655 在 BmN 细胞中的定位及与蛋白 NF90 的共定位

文献报道外显子 circRNA 主要定位于细胞质中<sup>[39]</sup>, 家蚕 circRNA\_5655 是由 5 个外显子环化而成。为了明确其在细胞中的定位, 我们将体外转录并环化的生物素标记的 15pmol circRNA-5655、circRNA-GFP 分别转染进 BmN 细胞, 48h 后收集细胞进行免疫荧光实验, 然后在蔡司(LSM-800)激光共聚焦显微镜下使用相同曝光值观察与拍照。以 BmN 细胞作为空白对照, 结果如图 3-13 所示, circRNA-GFP 主要定位于细胞质中, circRNA\_5655 在核、质中均有分布。

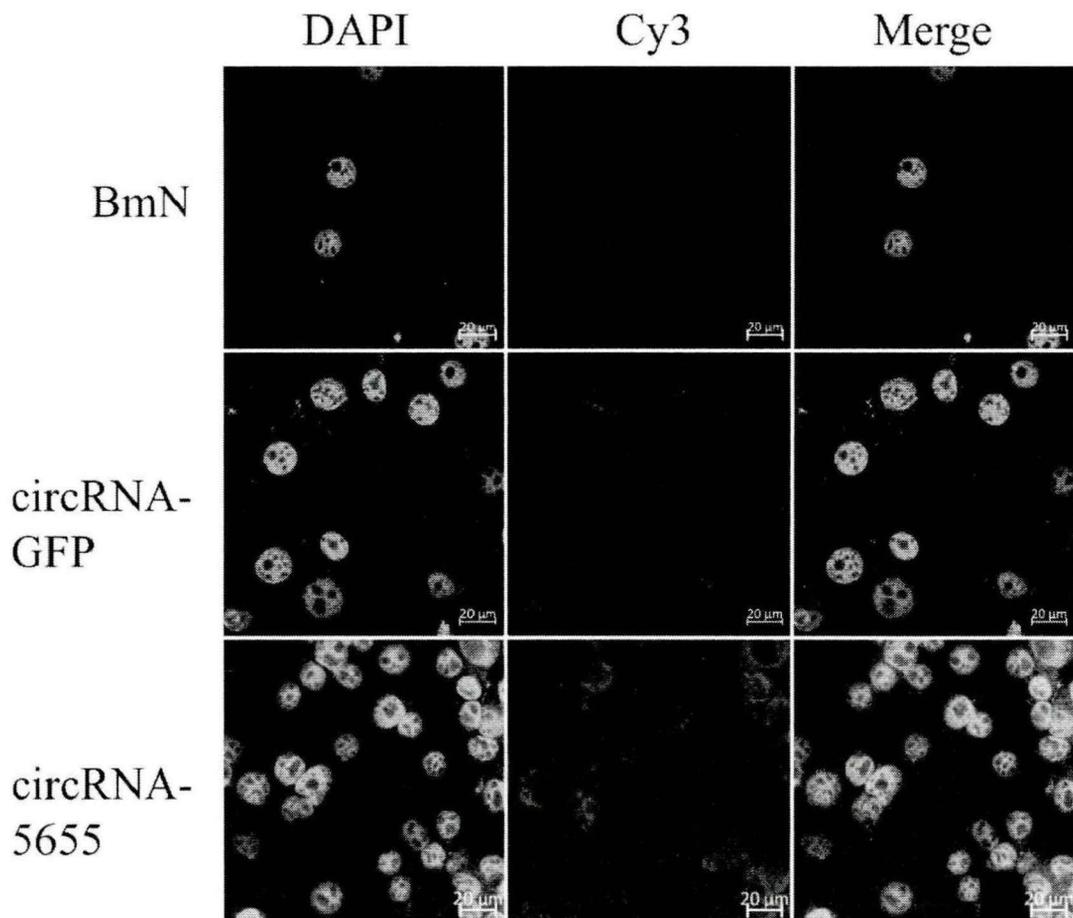


图 3-13 免疫荧光检测 circRNA-5655、circRNA-GFP 在 BmN 细胞中的定位  
Cy3: Cy3 标记的生物素抗体; DAPI: 核染料; circRNA-5655、circRNA-GFP: 由生

物素 NTPs 制备的环状 RNA 转染进 BmN 细胞

Fig 3-13 Immunofluorescence detection the location of circRNA-5655、circRNA-GFP in BmN cells

Cy3: Biotinylated antibody labeled with Cy3; DAPI: Nuclear dye; circRNA-5655、circRNA-GFP: circRNAs prepared by biotin NTPs transfected into BmN cells

已有研究表明，在哺乳类细胞中 NF90/NF110 蛋白能够非序列依赖性地结合 circRNA，并在环状 RNA 反向剪接调控和抗病毒感染上起到重要作用<sup>[18]</sup>。为了研究家蚕 circRNA 是否能与 NF90 蛋白相结合以发挥作用，分别转染 15pmol 生物素标记的线性化 circRNA-5655、circRNA-5655 和 circRNA-GFP 于 BmN 细胞，48h 后收集细胞用家蚕 NF90(XP\_021203181.1)鼠抗（本实验室蒋梦生制备）进行免疫荧光实验。在蔡司(LSM-800)激光共聚焦显微镜下观察环状 RNA 和 NF90 蛋白的共定位，从图 3-14 可见线性化 circRNA-5655，circRNA-GFP、circRNA-5655 均能与 NF90 蛋白共定位，说明家蚕 NF90 也能够非序列依赖性地结合 circRNA。

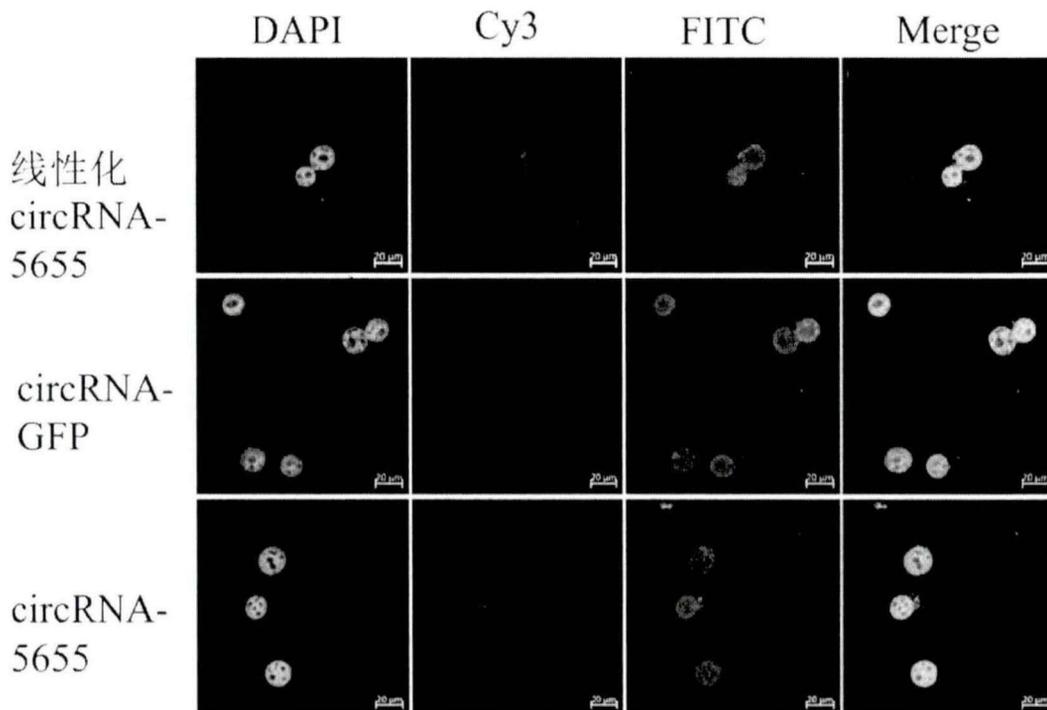


图 3-14 共聚焦观察 BmN 细胞中线性化 circRNA-5655、circRNA-GFP、circRNA-5655 与 NF90 蛋白共定位

DAPI: 核染料; FITC: FITC 标记的山羊抗鼠 IgG; Cy3: Cy3 标记的生物素抗体

Fig 3-14 Colocalization of linear RNA 5655、circRNA-GFP、circRNA-5655 with NF90 protein in BmN cells by Immunofluorescence tests with confocal microscopy

DAPI: Nuclear dye; FITC: FITC-labeled Goat Anti-mouse IgG; Cy3: Biotinylated antibody labeled with Cy3

### 3.6 circRNA\_5655 竞争结合 miRNA 对下游靶基因的影响

环状 RNA 广为人知的功能是可以起到 microRNA 海绵作用<sup>[12-14]</sup>，我们从家蚕 circRNAs 的高通量测序数据中，通过生物信息学的方法筛选出 circRNA\_5655 能够吸附 bmo-miR-3391-5p，调控下游靶基因家蚕神经肽受体 A35 (NGR-A35)和家蚕组蛋白去乙酰化酶 Rpd3 的表达（circRNA\_5655 与 bmo-miR-3391-5p 结合位点预测、bmo-miR-3391-5p 与靶 mRNA 的结合位点预测图见本章 2.3.8）。

为了验证上述 circRNA-miRNA-mRNA 互作网络，探讨 circRNA\_5655 能否充当 miRNA 海绵以解除其对下游靶基因表达的抑制作用，我们首先通过 circRNA-miRNA pull down 实验洗脱目的产物，并利用特异性引物对预测的 bmo-miR-3391-5p 进行 PCR 扩增，然后胶回收目的片段，克隆进 T 载体进行了 Sanger 测序验证，序列比对结果显示，所克隆的序列与 bmo-miR-3391-5p 对应区域的序列完全一致（见附录七），可见 circRNA\_5655 确实能够海绵吸附 bmo-miR-3391-5p。

为了进一步确认 circRNA\_5655 通过与 bmo-miR-3391-5p 互作调节下游靶基因的表达，我们构建了家蚕萤火虫荧光素酶表达载体（构建方法见本章 2.3.8），分别为 pOtu-Luc-mut（突变对照）、pOtu-Luc-A35 和 pOtu-Luc-Rpd3 载体，这些载体最终经 *SmaI* 和 *XbaI* 双酶切鉴定（图 3-15）。

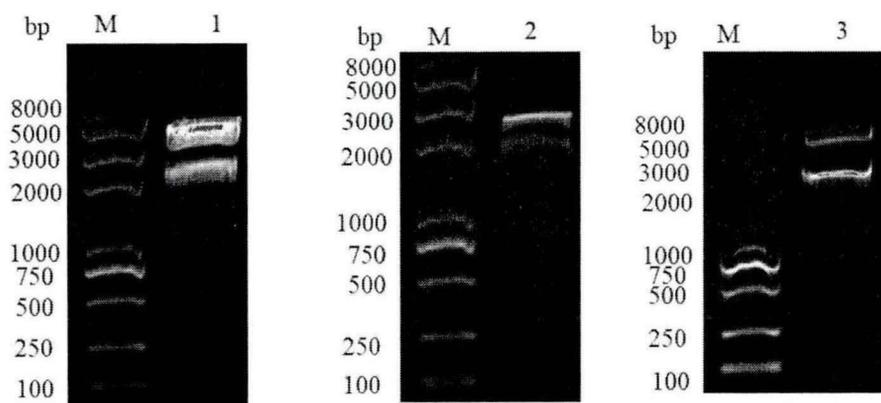


图 3-15 pOtu-Luc-mut/-A35/-Rpd3 酶切鉴定

M: DNA marker; 1: 重组质粒 pOtu-Luc-A35 经 *SmaI/XbaI* 双酶切鉴定; 2: 重组质粒 pOtu-Luc-Rpd3 经 *SmaI/XbaI* 双酶切鉴定; 3: 重组质粒 pOtu-Luc-mut 经 *SmaI/XbaI* 双酶切鉴定

Fig 3-15 Enzyme digestion identification of pOtu-Luc-mut/-A35/-Rpd3

M: DNA marker; 1: enzyme digestion of recombinant plasmid pOtu-Luc-A35 by *SmaI/XbaI*; 2: enzyme digestion of recombinant plasmid pOtu-Luc-Rpd3 by *SmaI/XbaI*; 3: enzyme digestion of recombinant plasmid pOtu-Luc-mut by *SmaI/XbaI*

用 1mL 无血清培养基将 2 $\mu$ g pOtu-Luc-mut、pOtu-Luc-A35 和 pOtu-Luc-Rpd3 载体分别与不同剂量(1 $\mu$ g、2 $\mu$ g、3 $\mu$ g)的 pIZT-LcR-5655 载体共转染  $2 \times 10^8$  个 BmN 细胞(阳性对照), 并设置 pIZT-LcR 载体阴性对照, 以 pRL-TK 载体为内参, 转染 60h 后检测萤火虫荧光素酶活与海肾荧光素酶活的比值。结果(n=3)显示, 在 pOtu-Luc-Rpd3 组中(图 3-16B), 相比与对照, 随着细胞中 circRNA\_5655 表达量的增加, 荧光素酶比活呈现显著上升趋势, 由此说明 circRNA\_5655 能够通过作用 bmo-miR-3391-5p 来激活下游靶基因家蚕组蛋白去乙酰化酶 Rpd3 的表达。而在转染 pOtu-Luc-A35 组中(图 3-16C), 与阴性对照相比, 随转染 pIZT-LcR-5655 量的增加, 荧光素酶比活大致呈现以剂量依赖方式上升。在 bmo-miR-3391-5p 互作位点突变的 Luc-mut 组中(图 3-16A), 转染 pIZT-LcR-5655 细胞的荧光素酶比活与转染 pIZT-LcR 的阴性对照并无明显差异, 可见靶基因位点突变导致了 circRNA\_5655 作用 bmo-miR-3391-5p 激活下游靶基因表达的功能丧失。

综上所述, 可以认为 circRNA\_5655 能够海绵吸附 bmo-miR-3391-5p, 以激活下游靶基因家蚕组蛋白去乙酰化酶 Rpd3、家蚕神经肽受体 A35 的表达。

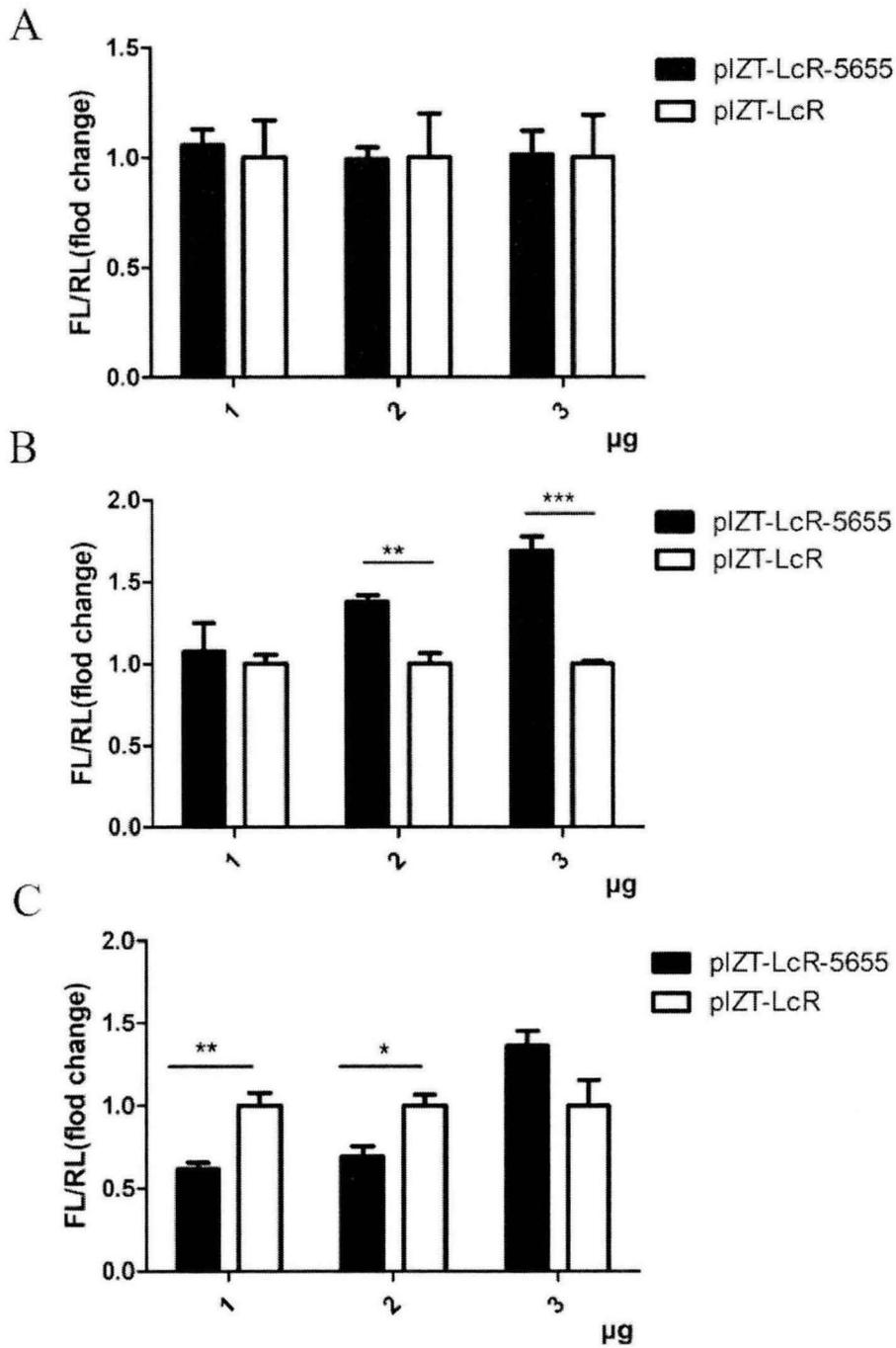


图 3-16 circRNA\_5655 与 bmo-miR-3391-5p 交互对下游靶基因的调节作用

(\*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ )

A: 共转染 pIZT-LcR-5655、pOtu-Luc-mut 和 pRL-TK; B: 共转染 pIZT-LcR-5655、pOtu-Luc-Rpd3 和 pRL-TK; C: 共转染 pIZT-LcR-5655、pOtu-Luc-A35 和 pRL-TK

Fig 3-16 Modulation of downstream target genes by interaction of circRNA\_5655 and bmo-miR-3391-5p (\*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ )

A: cells co-transfected by pIZT-LcR-5655、pOtu-Luc-mut and pRL-TK; B: cells co-transfected by pIZT-LcR-5655、pOtu-Luc-Rpd3 and pRL-TK; C: cells co-transfected by pIZT-LcR-5655、pOtu-Luc-A35 and pRL-TK

### 3.7 circRNA\_5655 对细胞免疫、凋亡相关基因表达的影响

用 1mL 无血清培养基将 3 $\mu$ g 的 pIZT-LcR 和 pIZT-LcR-5655 载体分别转染进  $2 \times 10^8$  个 BmN 细胞内, 48h 后提取细胞总 RNA, RT-qPCR 检测家蚕先天免疫、凋亡相关基因的表达水平。结果如图 3-17 所示, 过表达 circRNA\_5655 对先天凋亡通路中的 *p53*、*SUR* 基因表达有显著抑制作用, 对免疫通路中的 *STAT* 基因的表达也有抑制, 而对 *Apa*、*SPZ* 基因的表达水平没有明显影响。其中 *STAT* 基因与对照相比下调了 2.12 倍, 已有报道称 JAK/STAT 通路与果蝇的抗病毒效应密切相关<sup>[40]</sup>, 我们推断 circRNA\_5655 可以通过影响细胞的免疫应答, 从而调节 BmCPV 病毒的增殖。

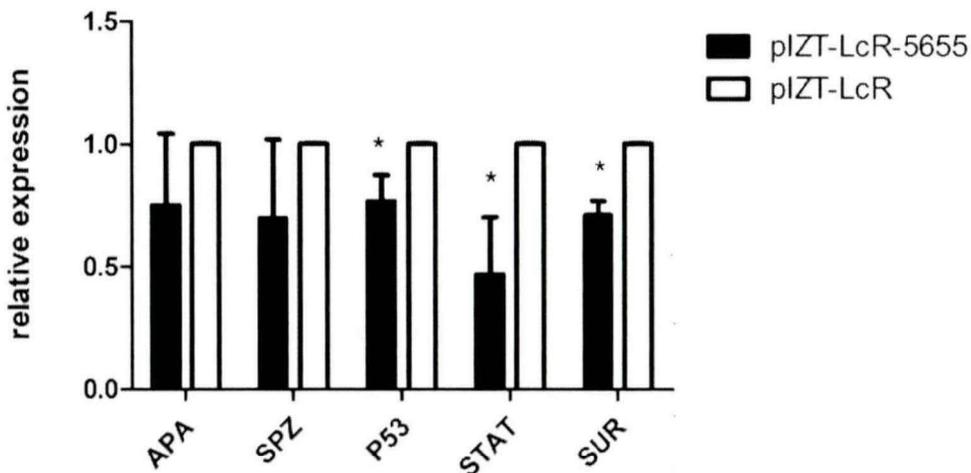


图 3-17 过表达 circRNA\_5655 对宿主免疫、凋亡相关基因表达的影响 (\* $p < 0.05$ )

Fig 3-17 Effect of overexpression of circRNA\_5655 on the expression of immunity and apoptosis-related genes (\* $p < 0.05$ )

已知家蚕 circRNA\_5655 的来源基因是组蛋白甲基转移酶, 并且 circRNA\_5655 通过 miRNA 海绵作用的下游靶基因是组蛋白去乙酰化酶 Rpd3, 因此我们推测 circRNA\_5655 的功能可能与组蛋白的修饰密切相关。真核生物的染色体是由组蛋白包裹 DNA 构成的, 这些组蛋白在细胞周期与凋亡进程中扮演着重要角色<sup>[41]</sup>。

为进一步明确家蚕 circRNA\_5655 对 BmN 细胞周期与凋亡的影响，分别转染 1 $\mu$ g、2 $\mu$ g、3 $\mu$ g 的 pIZT-LcR 和 pIZT-LcR-5655 载体到 2 $\times 10^8$  个 BmN 细胞中，48h 后收集细胞，用流式细胞仪检测细胞周期及细胞凋亡。结果显示，随着转染 pIZT-LcR-5655 水平的增加，处于 S 期的细胞比例比对照组有所增加，当转染最高剂量的 pIZT-LcR-5655 时，S 期细胞比例是对照的 1.23 倍。随着转染剂量的增加，实验组 G1 期的细胞比例分别为 49.848%、49.254%、47.497%，相比于对照组的 49.381%、51.794%、49.477% 呈现下降趋势，表明过表达 circRNA\_5655 能够驱使细胞由 G1 期向 S 期转化，促进细胞增殖（图 3-18）。

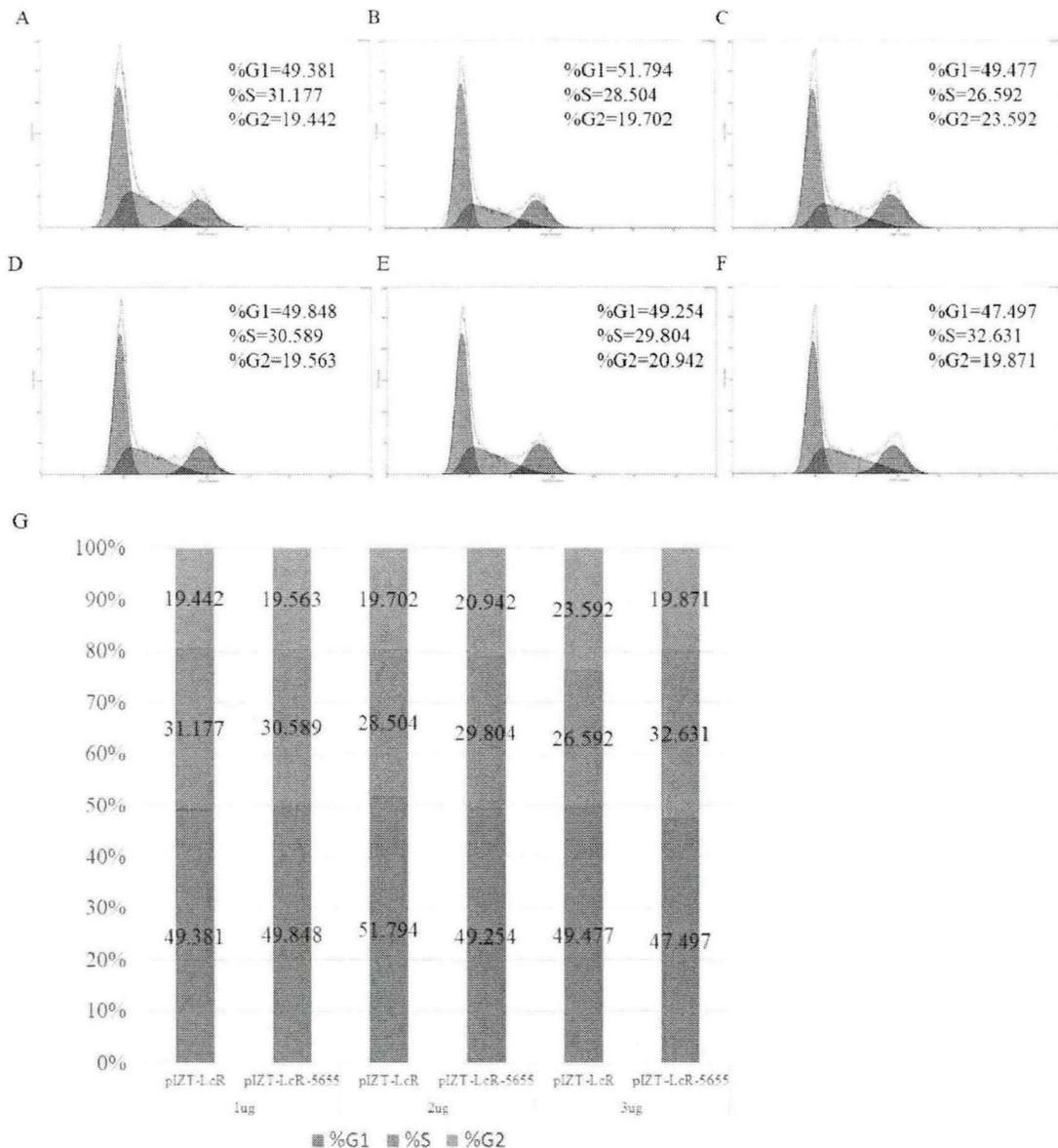


图 3-18 过表达 pIZT-LcR-5655 对 BmN 细胞周期的影响

A: 加 1 $\mu$ g pIZT-LcR 载体; B: 加 2 $\mu$ g pIZT-LcR 载体; C: 加 3 $\mu$ g pIZT-LcR 载体;  
D: 加 1 $\mu$ g pIZT-LcR-5655 载体; E: 加 2 $\mu$ g pIZT-LcR-5655 载体; F: 加 3 $\mu$ g  
pIZT-LcR-5655 载体; G: 细胞周期分布图

Fig 3-18 Effect of overexpressing pIZT-LcR-5655 on BmN cell cycle

A: 1 $\mu$ g pIZT-LcR vector; B: 2 $\mu$ g pIZT-LcR vector; C: 3 $\mu$ g pIZT-LcR vector; D: 1 $\mu$ g  
pIZT-LcR-5655 vector; E: 2 $\mu$ g pIZT-LcR-5655 vector; F: 3 $\mu$ g pIZT-LcR-5655 vector;  
G: Cell cycle map

细胞凋亡检测结果表明,随着转染 pIZT-LcR-5655 剂量的增加,实验组晚期凋亡的细胞比例分别为 25.15%、16.26%、17.66%,与相应的对照组(49.78%、31.98%、31.92%)相比,均有明显的降低,且早期凋亡的细胞比例也呈现出相同趋势,说明过表达 circRNA\_5655 能够对细胞凋亡起到抑制作用(图 3-19)。

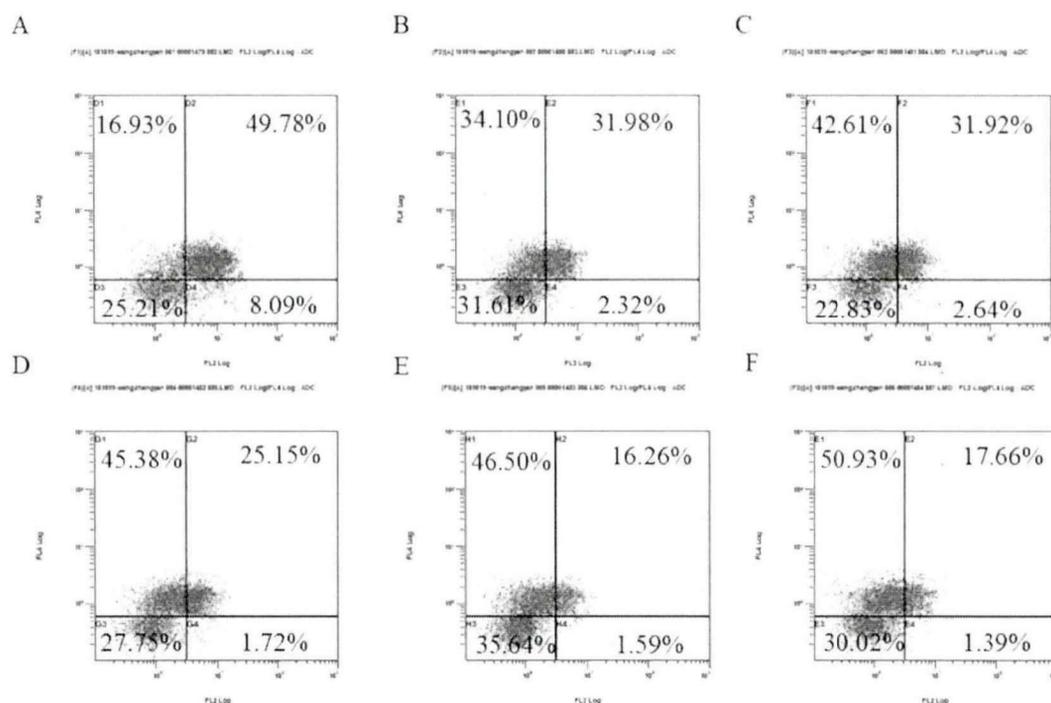


图 3-19 过表达 pIZT-LcR-5655 对 BmN 细胞凋亡的影响

(横坐标: Annexin V-PE 荧光; 纵坐标: 7-AAD 荧光; 左上象限: 坏死细胞; 左下象  
限: 活细胞; 右上象限: 晚期凋亡细胞; 右下象限: 早期凋亡细胞)

A: 加 1 $\mu$ g pIZT-LcR 载体; B: 加 2 $\mu$ g pIZT-LcR 载体; C: 加 3 $\mu$ g pIZT-LcR 载体;  
D: 加 1 $\mu$ g pIZT-LcR-5655 载体; E: 加 2 $\mu$ g pIZT-LcR-5655 载体; F: 加 3 $\mu$ g

## pIZT-LcR-5655 载体

Fig 3-19 Effect of overexpressing pIZT-LcR-5655 on cell apoptosis of BmN cells

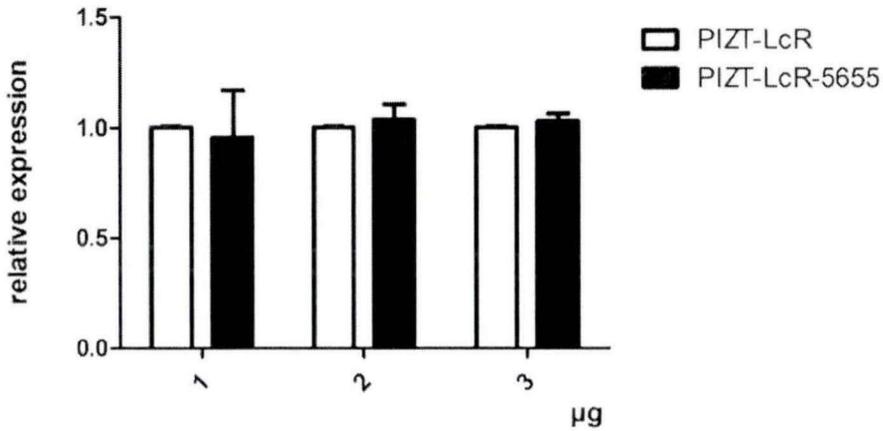
(Abscissa: Annexin V-PE fluorescence; ordinate: 7-AAD fluorescence; upper left quadrant: necrotic cells; lower left quadrant: living cells; upper right quadrant: late apoptotic cells; lower right quadrant: early apoptotic cells)

A: 1 $\mu$ g pIZT-LcR vector; B: 2 $\mu$ g pIZT-LcR vector; C: 3 $\mu$ g pIZT-LcR vector; D: 1 $\mu$ g pIZT-LcR-5655 vector; E: 2 $\mu$ g pIZT-LcR-5655 vector; F: 3 $\mu$ g pIZT-LcR-5655 vector

## 3.8 circRNA\_5655 对 BmCPV 增殖复制的影响

已有文献报道 BmCPV 的 S1 片段编码的 VP1 蛋白主要参与病毒粒子的装配, S7 片段可编码结构蛋白 VP7, 并与 BmCPV 病毒的增殖复制密切相关<sup>[33]</sup>。为了研究过表达 circRNA\_5655 对 BmCPV 病毒增殖复制的影响, 用 1mL 无血清培养基将不同剂量(1 $\mu$ g、2 $\mu$ g、3 $\mu$ g)的 pIZT-LcR 和 pIZT-LcR-5655 载体分别转染到  $2 \times 10^8$  个 BmN 细胞中, 48h 后加入 10 $\mu$ L 的 BmCPV 病毒粒子感染细胞, 48h 后利用荧光定量 PCR 和 Western blotting 分别检测细胞内 BmCPV 的 VP1、VP7 基因表达水平和病毒 VP7 的蛋白水平。结果显示, 过表达 circRNA\_5655 后, BmCPV 的 VP1 基因表达水平没有明显变化(图 3-20A), 但是在低剂量转染组(1 $\mu$ g、2 $\mu$ g), BmCPV 的 VP7 基因表达水平有所降低(图 3-20B), 但在高剂量转染组(3 $\mu$ g) VP7 基因表达水平高于相应的对照组。从 Western blotting 的灰度扫描结果也可以看出(图 3-21), 转染不同剂量(1 $\mu$ g、2 $\mu$ g、3 $\mu$ g)的 pIZT-LcR-5655 载体后, 病毒的 VP7 蛋白水平分别为对照的 0.3 倍, 0.6 倍和 1.2 倍, 其变化趋势与定量 PCR 的检测结果一致, 说明低浓度 circRNA\_5655 对病毒的增殖有抑制作用, 但是这种抑制作用随着浓度的增加而减弱。

A



B

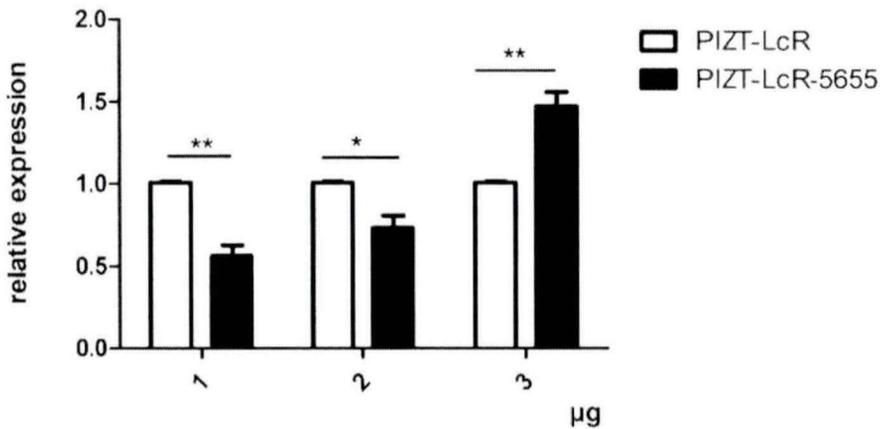


图 3-20 过表达 circRNA\_5655 对 BmCPV 增殖复制的影响 (\*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ )

A: 转染 1、2、3µg 的 pIZT-LcR 及 pIZT-LcR-5655 载体对 BmCPV 的 VP1 基因的 RT-qPCR 检测; B: 转染 1、2、3µg 的 pIZT-LcR 及 pIZT-LcR-5655 载体对 BmCPV 的 VP7 基因的 RT-qPCR 检测

Fig 3-20 Effect of overexpression of circRNA\_5655 on proliferation and replication of BmCPV (\*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ )

A: RT-qPCR detection of VP1 gene of BmCPV by transfecting 1、2、3µg of pIZT-LcR and pIZT-LcR-5655 vectors; B: RT-qPCR detection of VP7 gene of BmCPV by transfecting 1、2、3µg of pIZT-LcR and pIZT-LcR-5655 vectors

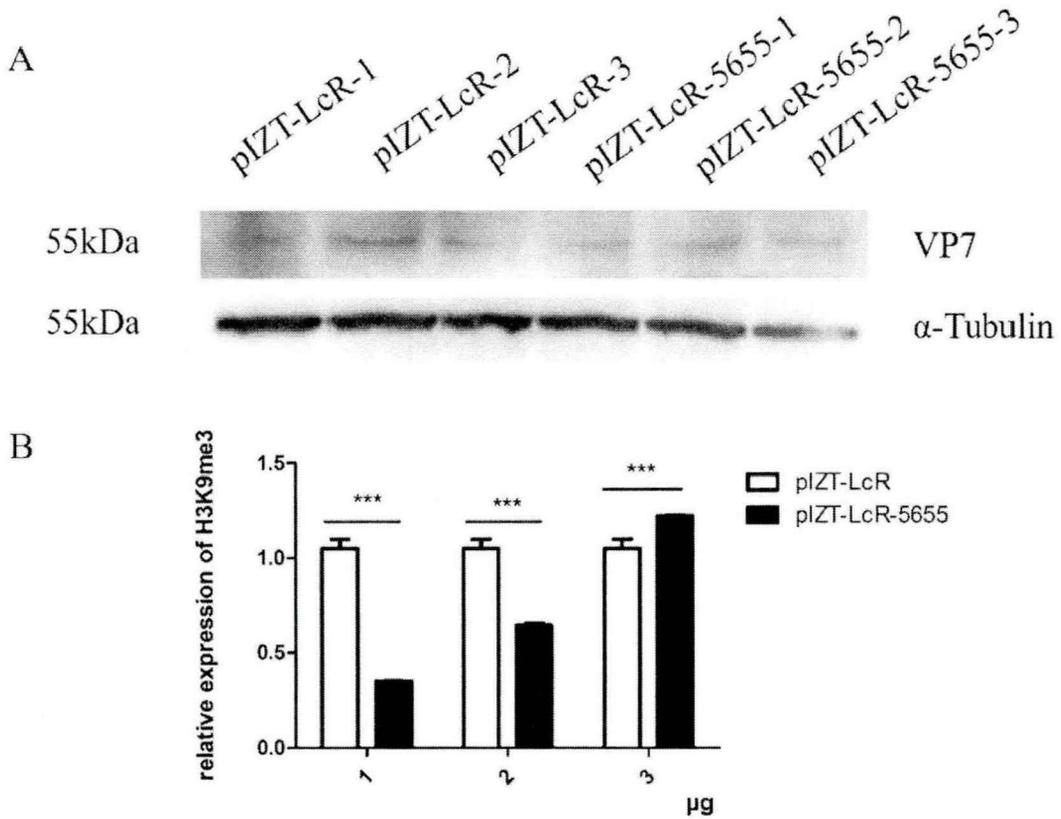


图 3-21 过表达 circRNA\_5655 对感染细胞中 VP7 蛋白水平的影响 (\*\* $p < 0.001$ )

A: 过表达 pIZT-LcR-5655 对 VP7 蛋白的 Western Blotting 检测 (pIZT-LcR-1、-2、-3 分别为转染 1、2、3 $\mu$ g 的 pIZT-LcR 载体, pIZT-LcR-5655-1、-2、-3 分别为转染 1、2、3 $\mu$ g 的 pIZT-LcR-5655 载体, VP7 一抗为实验室自制鼠抗, 内参一抗为  $\alpha$ -Tubulin 鼠抗, 二抗均为 HRP 标记山羊抗鼠 IgG); B: Western Blotting 条带灰度扫描结果

Fig 3-21 Effect of overexpression of circRNA\_5655 on VP7 protein level in the BmCPV infected cells (\*\* $p < 0.001$ )

A: VP7 protein level in the BmCPV infected cells was determined by Western blotting, pIZT-LcR-1、-2、-3: cells transfected by 1、2、3 $\mu$ g of pIZT-LcR, pIZT-LcR-5655-1、-2、-3: cells transfected by 1、2、3 $\mu$ g of pIZT-LcR-5655, Anti VP7 Mouse Polyclonal Antibody and alpha Tubulin Mouse McAb are the primary antibody, the second antibody are HRP-labeled Goat Anti-mouse IgG; B: Grayscale of Western blotting image

## 3.9 circRNA\_5655 与蛋白的相互作用

为了研究 circRNA\_5655 能否通过与某些蛋白质互作发挥作用，我们通过 circRNA-protein pull down 实验捕获与 circRNA\_5655 互作的候选蛋白（图 3-22），并同时设置 circRNA-GFP 和线性化 circRNA-5655 对照。circRNA-protein pull down 沉淀复合物 SDS\_PAGE 分离后，经银染发现 2 条差异带，1 号条带（32kDa 左右）为 circRNA-5655 线性分子特有，2 号条带（40kDa 左右）为 circRNA-5655 特有，割胶回收差异条带，并送至上海中科新生命生物科技有限公司进行质谱筛选与鉴定（附录八）。

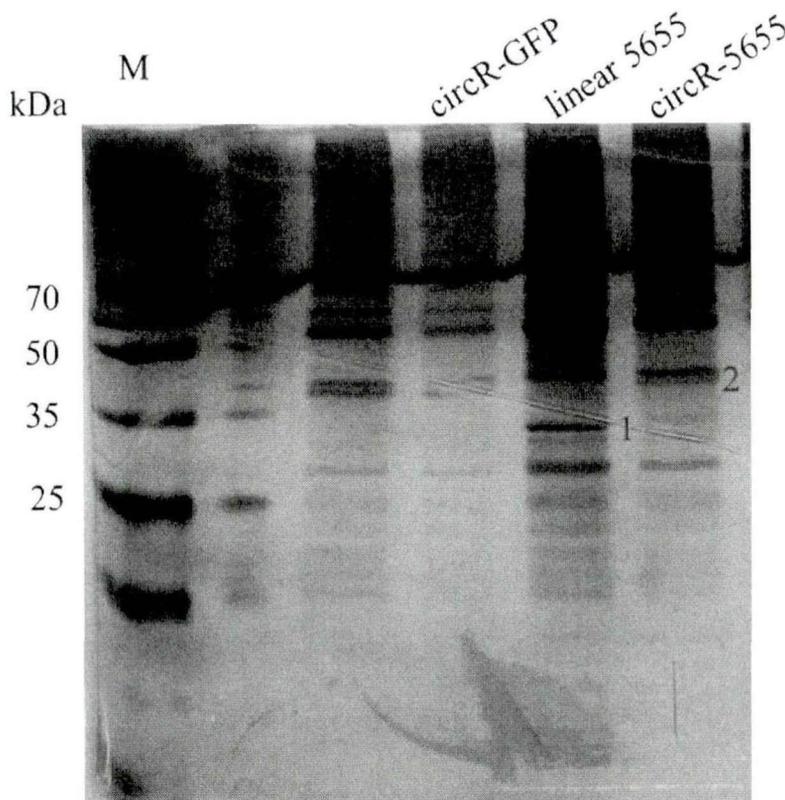


图 3-22 circRNA\_5655 pull down 蛋白后 SDS-PAGE 分析（银染）

Fig 3-22 SDS-PAGE analysis of circRNA\_5655 pull down protein (silver staining)

与 circRNA\_5655 线性分子互作的候选蛋白有 GTP 酶活化蛋白异构体 X1、GTP 酶活化蛋白异构体 X1 等（表 3-8），与 circRNA\_5655 互作的候选宿主蛋白为胆碱-磷酸胞苷酰转移酶 B 亚型 X2、线粒体硫胺素焦磷酸盐载体、琥珀酸脱氢酶组装因子 2-B、动力蛋白  $\beta$  链、液泡蛋白分选相关蛋白 11 同源物等，circRNA\_5655 与这些宿主蛋白的互作有待后续验证。

表 3-8 Pull down 筛选出的互作蛋白的质谱鉴定

Table 3-8 Mass Spectrometric Identification of Interaction Proteins Screened by Pull Down

No.	Protein Name	Accession No.	MW (kDa)/ pI	Sequence
1	GTPase-activating protein isoform X2	XP_004924621.1	148492.6/9.15	LTPFFFK
	GTPase-activating protein isoform X1	XP_021202614.1	148712.7/9.15	LTPFFFK
2	choline-phosphate cytidylyltransferase B isoform X2	XP_004922988.1	44485.8/5.79	YEAVRHCR
	mitochondrial thiamine pyrophosphate carrier	XP_004932920.1	36075/9.32	LQIQGFQHR
	succinate dehydrogenase assembly factor 2-B, mitochondrial isoform X1	XP_021204918.1	17246.8/9.28	EFDNEIMNLLK
	dynein beta chain, ciliary-like	XP_012545240.2	527675.1/5.31	GLFERDK
	vacuolar protein sorting-associated protein 11 homolog	XP_012545909.1	118157/6.05	MQEGQSK

#### 4 讨论

通过对家蚕 circRNAs 高通量测序结果的分析, 我们推测 circRNA\_5655 可能在宿主基因的表达调控及 BmCPV 的感染应答方面发挥重要的作用。研究发现果蝇 *laccase2* 基因的内含子 1、2 反向重复序列能够有效驱动果蝇和人体细胞中多种外显子的环化<sup>[35]</sup>, 据此我们构建出家蚕 circRNA 的表达载体, 并 qPCR 验证了 circRNA\_5655 的表达量在 BmN 细胞中上调了上千倍, 表明家蚕 circRNA\_5655 体内成环载体(pIZT-LcR-5655)已成功构建。据报道 circRNA 能够在转录及转录后水平上调控其亲本基因的表达<sup>[42]</sup>, 一方面, circRNA 是 mRNA 的共转录产物, 环状 RNA 的形成与线性 RNA 之间存在竞争性平衡关系, 进而影响亲本基因的转录及蛋白翻译。另一方面, circRNA 可以与特定的 RNA 结合蛋白相互结合影响亲本基因的表达。过表达 circRNA\_5655 后, RT-qPCR 结果显示其亲本基因家蚕组蛋白甲基转移酶的转录水平显著降低。其原因可能是转染进细胞的 circRNA\_5655 竞争性结合了 RNA 聚合酶 II, 从而使得 RNA 聚合酶 II 无法正常结合到亲本基因的上游启动子处, 抑制了基因的转录起始<sup>[43]</sup>。

已知 circRNA\_5655 亲本基因为家蚕组蛋白甲基转移酶, 它能够特异性地使家蚕卵巢中组蛋白 H3 的第 9 位赖氨酸发生三甲基化, 在异染色质的形成及基因表达调控等方面扮演重要角色<sup>[38]</sup>。Western Blotting 检测过表达 circRNA\_5655 对 H3K9me3 蛋白的影响, 结果显示 H3K9me3 蛋白水平有一定程度提高。组蛋白甲

基化在调节基因的活性方面发挥着重要作用, 已有研究表明 H3K9 甲基化的功能因发生的区域而异, 如 H3K9 甲基化发生在启动子上时会导致基因沉默, 但是在某些基因编码区发生甲基化却可以促进基因转录<sup>[44]</sup>。组蛋白甲基化修饰的紊乱会导致癌症的产生, 如 H3K9 组蛋白甲基转移酶 G9a 能够使细胞粘附分子 Ep-CAM 沉默以促进肺癌侵袭与转移<sup>[45]</sup>, 组蛋白去甲基化酶 JMJD2B 可以协调 H3K4 /H3K9 甲基化促使激素反应性乳腺癌产生<sup>[46]</sup>。因此可以推测 circRNA\_5655 可能通过提升 H3K9me3 的水平在 BmN 细胞的增殖与凋亡方面发挥重要作用。

环状 RNA 广泛具有 microRNA 海绵的作用, 这种海绵作用最有力的证据来源于 circRNA CiRS-7 的研究<sup>[47]</sup>, 此环状 RNA 包含 70 多个 miR-7 的潜在结合位点, 可充当 ceRNA, 对肿瘤的发生具有深远的影响。我们通过 circRNA-miRNA pull down 和双荧光素报告系统以验证高通量测序数据中 circRNA-miRNA-mRNA 的互作网络, 结果可知 circRNA\_5655 能够起到 bmo-miR-3391-5p 海绵作用来激活下游靶基因家蚕组蛋白去乙酰化酶 Rpd3 和家蚕神经肽受体 A35 基因的表达。组蛋白乙酰化和基因的转录激活相关, 且组蛋白间的修饰作用是互相平衡的竞争性修饰<sup>[48]</sup>。甲基化的 H3K9 能够与组蛋白去乙酰化酶共同作用使组蛋白脱乙酰化而致使染色质紧缩, 最终导致基因转录阻滞<sup>[49]</sup>。我们推测 circRNA\_5655 的功能与组蛋白的修饰密切相关, 在真核生物中, 组蛋白在细胞周期与凋亡进程中都起到重要的作用, 通过流式细胞仪检测发现过表达 circRNA\_5655 能够促进细胞增殖, 抑制细胞凋亡。已有研究表明, 纳米粒子 TiO<sub>2</sub> 能够刺激家蚕神经肽受体上调表达, 促进家蚕的摄食, 生长和吐丝<sup>[50]</sup>。家蚕神经肽受体 BNGR-A21 通过激活 Gq 和 Gs 信号级联反应, 导致细胞内 cAMP 积累, Ca<sup>2+</sup>动员和 ERK1/2 磷酸化, 在调节幼虫生长和蚕丝生产中起着重要作用<sup>[51]</sup>。circRNA\_5655 可能通过调节家蚕神经肽受体 A35 基因的表达, 影响家蚕的生长, 食欲和纺丝。

过表达 circRNA\_5655 后, RT-qPCR 检测显示家蚕免疫相关基因 *STAT* 比于对照下调了 2.12 倍, 已知 JAK/STAT 通路与果蝇的抗病毒效应密切相关<sup>[40]</sup>, 因此推断过表达 circRNA\_5655 可能与 BmCPV 病毒的增殖复制相关, 并影响细胞的免疫应答。接着我们过表达 circRNA\_5655, 分别利用 qPCR 和 Western blotting 检测 BmN 细胞内 BmCPV 的 VP1 和 VP7 的基因表达水平和病毒 VP7 的蛋白水平。结果显示, circRNA\_5655 对 BmCPV 增殖复制的反馈调节作用。BmCPV 感染后 circRNA\_5655

表达水平上调, circRNA\_5655 水平又反过来影响 BmCPV 的感染, 低浓度的 circRNA\_5655 能够有效抑制病毒的增殖复制, 但随着浓度的增加该抑制作用呈现减弱的趋势, 因此 circRNA\_5655 对 BmCPV 的增殖复制有精细调节作用。

通过 circRNA-protein pull down 和质谱鉴定发现, circRNA\_5655 与胆碱-磷酸胞苷酰转移酶 B 亚型 X2、线粒体硫胺素焦磷酸盐载体、琥珀酸脱氢酶组装因子 2-B、动力蛋白  $\beta$  链、液泡蛋白分选相关蛋白 11 同源物等蛋白质相互作用。磷酸胆碱胞苷酰转移酶在神经元生长方面具有重要作用<sup>[52]</sup>。硫胺素能够响应外界刺激来促进线粒体氧化, 较快释放活性氧(ROS)从而介导下游信号转导的激活<sup>[53]</sup>。拟南芥根部的正常生长需要琥珀酸脱氢酶组装因子 2 的参与<sup>[54]</sup>。胞内膜泡运输由动力蛋白驱动, 而液泡蛋白分选相关蛋白 11 基因的错义突变与神经轴索萎缩症密切相关<sup>[55]</sup>。在 BmCPV 感染应激下, circRNA\_5655 可能与这些宿主蛋白互作, 致使家蚕发育瘦小、食欲减退、行动迟缓, 但其相互作用的验证及机制仍有待后续研究。

### 参考文献

- [1] Jeck W R , Sorrentino J A , Wang K , et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats[J]. RNA, 2013, 19(2):141-157.
- [2] Jeck W R, Sharpless N E. Detecting and characterizing circular RNAs[J]. Nature Biotechnology, 2014, 32(5):453-61.
- [3] Guo J U , Agarwal V , Guo H , et al. Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs[J]. Genome Biology, 2014, 15(7).
- [4] Salzman J , Gawad C , Wang P L , et al. Circular RNAs Are the Predominant Transcript Isoform from Hundreds of Human Genes in Diverse Cell Types[J]. PLoS ONE, 2012, 7(2):e30733.
- [5] Kramer M C , Liang D , Tatomer D C , et al. Combinatorial control of Drosophila circular RNA expression by intronic repeats, hnRNPs, and SR proteins[J]. Genes & development, 2015, 29(20):2168.
- [6] Ivanov A , Memczak S , Wyler E , et al. Analysis of Intron Sequences Reveals Hallmarks of Circular RNA Biogenesis in Animals[J]. Cell Reports, 2015, 10(2):170-177.
- [7] Ashwal-Fluss R , Meyer M , Pamudurti N , et al. circRNA Biogenesis Competes with Pre-mRNA Splicing[J]. Molecular Cell, 2014, 56(1):55-66.

- [8] Zhang X O , Wang X B , Zhang Y , et al. Complementary Sequence-Mediated Exon Circularization[J]. *Cell*, 2014, 159(1):134-147.
- [9] Starke S , Jost I , Rossbach O , et al. Exon Circularization Requires Canonical Splice Signals[J]. *Cell Reports*, 2015, 10(1):103-111.
- [10] Salzman J , Chen R E , Olsen M N , et al. Cell-Type Specific Features of Circular RNA Expression[J]. *PLoS Genetics*, 2013, 9(9):e1003777.
- [11] Rybak-Wolf A , Stottmeister C , Gla?Ar P , et al. Circular RNAs in the Mammalian Brain Are Highly Abundant, Conserved, and Dynamically Expressed[J]. *Molecular Cell*, 2015, 58(5):870-885.
- [12] Memczak S , Jens M , Elefsinioti A , et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency[J]. *Nature*, 2013, 495(7441):333-338.
- [13] Hansen T B , Jensen T I , Clausen B H , et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges[J]. *Nature*, 2013, 495(7441):384-388.
- [14] Piwecka M , Gla?Ar P , Hernandez-Miranda L R , et al. Loss of a mammalian circular RNA locus causes miRNA deregulation and affects brain function[J]. *Science*, 2017:eaam8526.
- [15] Neural circular RNAs are derived from synaptic genes and regulated by development and plasticity[J]. *Nature Neuroscience*, 2015, 18(4):603-610.
- [16] Li Z , Huang C , Bao C , et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2015, 22(3):256-264.
- [17] Du W W , Zhang C , Yang W , et al. Identifying and Characterizing circRNA-Protein Interaction[J]. *Theranostics*, 2017, 7(17):4183-4191.
- [18] Li X , Liu C X , Xue W , et al. Coordinated circRNA Biogenesis and Function with NF90/NF110 in Viral Infection[J]. *Molecular Cell*, 2017:S1097276517303635.
- [19] Aspden J L , Chen E W Y , Phillips R J , et al. Extensive translation of small Open Reading Frames revealed by Poly-Ribo-Seq[J]. *eLife*, 2014, 3.
- [20] Galindo, M?ximo Ibo, Pueyo, Jos? Ignacio, Fouix S , et al. Peptides Encoded by Short ORFs Control Development and Define a New Eukaryotic Gene Family[J]. *PLoS Biology*, 2007, 5(5):e106.
- [21] Andrews S J , Rothnagel J A . Emerging evidence for functional peptides encoded by short open reading frames[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2014, 15(3):193-204.
- [22] Ladoukakis E , Pereira V , Magny E G , et al. Hundreds of putatively functional

- small open reading frames in *Drosophila*[J]. *Genome Biology*, 2011, 12(11):R118.
- [23] Laressergues D , Couzigou J M , Hélène San Clemente, et al. Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides[J]. *Nature*, 2015, 520(7545).
- [24] Magny E G , Pueyo J I , Pearl F M G , et al. Conserved Regulation of Cardiac Calcium Uptake by Peptides Encoded in Small Open Reading Frames[J]. *Science*, 2013, 341(6150):1116-1120.
- [25] Pamudurti N R, Bartok O, Jens M, et al. Translation of CircRNAs[J]. *Molecular Cell*, 2017, 66(1):9.
- [26] Legnini I , Di Timoteo G , Rossi F , et al. Circ-ZNF609 Is a Circular RNA that Can Be Translated and Functions in Myogenesis[J]. *Molecular Cell*, 2017, 66(1):22-37.e9.
- [27] Yang Y, Fan X, Mao M, et al. Extensive translation of circular RNAs driven by N6-methyladenosine.[J]. *Cell Research*, 2017, 27(5):626.
- [28] Zhang M , Huang N , Yang X , et al. A novel protein encoded by the circular form of the SHPRH gene suppresses glioma tumorigenesis[J]. *Oncogene*, 2018, 37(13).
- [29] Yang Y , Gao X , Zhang M , et al. Novel Role of FBXW7 Circular RNA in Repressing Glioma Tumorigenesis[J]. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 2018, 110(3).
- [30] Hayashi Y , Kawase S . Base pairing in ribonucleic acid extracted from the cytoplasmic polyhedra of the silkworm[J]. *Virology*, 1964, 23(4):611-614.
- [31] Payne C C , Rivers C F . A Provisional Classification of Cytoplasmic Polyhedrosis Viruses Based on the Sizes of the RNA Genome Segments[J]. *Journal of General Virology*, 1976, 33(1):71-85.
- [32] Yu X, Jin L, Zhou Z H. 3.88 A structure of cytoplasmic polyhedrosis virus by cryo-electron microscopy[J]. *Nature*, 2008, 453(7193):415-419.
- [33] 何蕾. 家蚕质型多角体病毒(BmCPV)基因组片段 7(S7)功能的研究[D]. 苏州大学, 2014.
- [34] Guo H Z , Jiang L , Xia Q Y . Selection of reference genes for analysis of stress-responsive genes after challenge with viruses and temperature changes in the silkworm *Bombyx mori*[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2016, 291(2):999-1004.
- [35] Kramer M C , Liang D , Tatomer D C , et al. Combinatorial control of *Drosophila*

- circular RNA expression by intronic repeats, hnRNPs, and SR proteins[J]. *Genes & development*, 2015, 29(20):2168.
- [36] Li Z, Huang C, Bao C, et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2015, 22(3):256–264.
- [37] Abdelmohsen K, Pullmann R, Lal A, et al. Phosphorylation of HuR by Chk2 Regulates SIRT1 Expression[J]. *Molecular Cell*, 2007, 25(4):543-557.
- [38] Chen B, Yu M, Chang Q, et al. Mdig de-represses H19 large intergenic non-coding RNA (lincRNA) by down-regulating H3K9me3 and heterochromatin[J]. *Oncotarget*, 2013, 4(9):1427-37.
- [39] Jeck W R, Sharpless N E. Detecting and characterizing circular RNAs[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(5):453–461.
- [40] Dostert C, Jouanguy E, Irving P, et al. The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of drosophila[J]. *Nature Immunology*, 2005, 6(9): 946.
- [41] Osley M A. The regulation of histone synthesis in the cell cycle[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1991, 60(1):827-861.
- [42] Sun W , Yang X , Li X , et al. Circular RNA: A new star of noncoding RNAs[J]. *Cancer Letters*, 2015, 365(2):141-148.
- [43] Yakovchuk P , Goodrich J A , Kugel J F . B2 RNA and Alu RNA repress transcription by disrupting contacts between RNA polymerase II and promoter DNA within assembled complexes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(14):5569-5574.
- [44] Vakoc C R , Mandat S A , Olenchock B A , et al. Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin.[J]. *Molecular Cell*, 2005, 19(3):381-391.
- [45] Chen M W, Hua K T, Kao H J, et al. H3K9 Histone Methyltransferase G9a Promotes Lung Cancer Invasion and Metastasis by Silencing the Cell Adhesion Molecule Ep-CAM[J]. *Cancer Research*, 2010, 70(20):7830-7840.
- [46] Shi L , Sun L , Li Q , et al. Histone demethylase JMJD2B coordinates H3K4/H3K9 methylation and promotes hormonally responsive breast carcinogenesis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(18):7541-7546.
- [47] Peng L, Yuan XQ, Li GC. The emerging landscape of circular RNA ciRS-7 in cancer (Review) [J]. *Oncol Reports*, 2015, 33:2669–74.

- [48] Suganuma T , Workman J L . Crosstalk among Histone Modifications[J]. Cell, 2008, 135(4):0-607.
- [49] Kikuno N , Shiina H , Urakami S , et al. Genistein mediated histone acetylation and demethylation activates tumor suppressor genes in prostate cancer cells[J]. International journal of cancer. Journal international du cancer, 2008, 123(3):552-560.
- [50] Nanoparticulate anatase TiO<sub>2</sub> (TiO<sub>2</sub> NPs) upregulates the expression of silkworm (Bombyx mori) neuropeptide receptor and promotes silkworm feeding, growth, and silking[J]. Peptides, 2015, 68:64-71.
- [51] Yang J , Huang H , Yang H , et al. Specific Activation of the G Protein-coupled Receptor BNGR-A21 by the Neuropeptide Corazonin from the Silkworm, Bombyx mori, Dually Couples to the Gq and Gs Signaling Cascades[J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(17):11662-11675.
- [52] Carter J M , Waite K A , Campenot R B , et al. Enhanced expression and activation of CTP:phosphocholine cytidylyltransferase beta2 during neurite outgrowth[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(45):44988-44994.
- [53] Zhou J , Sun A , Zeng L , et al. Thiamin Promotes Plant Rapid Response to External Stress through Improving Mitochondrial Oxidation Status[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2012.
- [54] Huang S , Taylor N L , Ströher E , et al. Succinate dehydrogenase assembly factor 2 is needed for assembly and activity of mitochondrial complex II and for normal root elongation in Arabidopsis[J]. Plant Journal, 2013, 73(3):429-441.
- [55] Lucot K L , Dickinson P J , Finno C J , et al. A Missense Mutation in the Vacuolar Protein Sorting 11 ( VPS11 ) Gene Is Associated with Neuroaxonal Dystrophy in Rottweiler Dogs[J]. G3-Genes Genomes Genetics, 2018, 8(8):g3.200376.2018.

## 第四章 circRNA\_5655 具编码蛋白的功能

**摘要：** circRNA\_5655 长 563bp，起源于家蚕 histone-lysine N-methyltransferase eggless(LOC101742950)的第 9-13 个外显子。生物信息学分析结果显示，circRNA\_5655 具有 m6A 甲基化修饰位点(GGACC)，并且包含跨 circRNA\_5655 反向剪接位点的开放阅读框 ORF1，可能编码含有 122 个氨基酸残基的蛋白 circR-P122。合成其特异性小肽 RRNSVVRTNASARSRFAC，并制备兔源多克隆抗血清，Western Blotting 可在家蚕中肠中检测到 circR-P122 蛋白的表达。BmN 细胞和家蚕中肠组织的免疫荧光结果显示，circR-P122 主要定位于细胞质中。Western blotting 结果显示，过表达 circR-P122 蛋白后组蛋白甲基化水平有所抑制。

**关键词：** circRNA\_5655；circR-P122；细胞定位；H3K9me3

### 1 引言

环状 RNA (circRNA) 被认为是真核细胞中功能性的非编码转录物<sup>[1]</sup>。最近的研究表明，尽管 circRNA 通常在细胞中以低水平表达，但它们可能参与许多生理及病理过程，如基因调控，组织发育和癌症发生<sup>[2]</sup>。大量研究报道了 circRNAs 及其相关的功能，如 circRNA 可以作为 miRNA 海绵起作用<sup>[3]</sup>，从而减少 miRNA 靶向 mRNA 的能力。虽然 microRNA 海绵功能已得到很好地验证，但是只有少数 circRNA 含有多个 microRNA 的结合位点，这表明 circRNA 可能具有尚未探索到的功能<sup>[4,5]</sup>。

最新的研究表明，当 circRNA 含有由内部核糖体进入位点 (IRES) 驱动开放阅读框 (ORF) 时，可以翻译功能性蛋白质。circ-SHPRH 能够翻译出一个 17kDa 的小肽 SHPRH-146aa，它能保护 SHPRH 免于泛素蛋白酶体的降解，而稳定的 SHPRH 可以作为 E3 连接酶对 PCNA 进行泛素化修饰，最终导致细胞增殖和致癌性受到抑制<sup>[6]</sup>。其他研究发现，运用核糖体新生链复合物结合 RNA 测序 (RNC-seq) 分析得知，一种长链非编码 RNA (LINC-PINT) 产生的内源性 circRNA 能够编码调节肽。此肽能够直接与聚合酶相关因子复合物 (PAF1c) 相互作用并抑制多种癌基因的转录延伸，从而抑制胶质母细胞瘤肿瘤的发生<sup>[7]</sup>。

目前,已有两大策略用于鉴定 circRNA 的翻译潜能,一种是 circRNA 具有潜在的内部核糖体进入位点(IRES),另一种是 circRNA 存在 m6A 甲基化修饰位点。

N6-腺苷酸甲基化(m6A)是真核生物中一种常见的转录后修饰,其已被证明在癌症发生<sup>[8]</sup>、神经发育<sup>[9]</sup>、病毒感染<sup>[10]</sup>、干细胞分化<sup>[11]</sup>中发挥作用。大多数 RNA 甲基化酶的识别位点是“RRACH”序列<sup>[12]</sup>,其中各碱基的分布概率如下:[G/A/U][G>A]m6AC[U>A>C]。m6A 修饰被认为是一个动态可逆的过程,由甲基化转移酶(Writers)、去甲基化酶(Erasers)和甲基化阅读蛋白(Readers)等蛋白质共同调控<sup>[13]</sup>。m6A 修饰的 circRNA 被证明有助于 circRNA 的翻译起始<sup>[14]</sup>,其翻译的多肽可能具有重要的生物学和临床意义。

前面的研究已经明确了家蚕 circRNA\_5655 在宿主基因表达调控中的重要作用,及其对 BmCPV 病毒的增殖复制的影响。本研究在预测家蚕 circRNA\_5655 翻译蛋白的基础上,通过 Western blot、免疫荧光证实 circRNA\_5655 可以编码蛋白。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 载体与生物材料

载体:带有 T7 启动子序列的 circRNA\_5655 线性分子克隆进 pMD19-T 载体由本人上一章构建;pIZT/V5-His 载体由本实验室保存。

菌种:Trans5 $\alpha$  购自北京全式金生物公司(TransGen Biotech)

生物材料:

家蚕卵巢细胞系(BmN),由本研究室保存;家蚕中肠组织冰冻切片由苏州堪赛尔生物技术有限公司制备;由南京金斯瑞生物科技有限公司人工合成 circR-P122 特异性小肽“RRNSVRTNASARSRFAC”,并制备其兔源多克隆抗血清。

#### 2.1.2 工具酶及试剂盒

Tris-Tricine-SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒购于 Solarbio 公司。

#### 2.1.3 其他试剂

超低分子量蛋白 Marker、2 $\times$ Tricine 上样缓冲液均购于 Real Timer 公司。1 $\times$ Tris-tricine-SDS-PAGE 电泳缓冲液(阴极-)、1 $\times$ Tris-tricine-SDS-PAGE 电泳缓冲液(阳极+)均购于 Solarbio 公司。 $\alpha$ -Tubulin 抗体购于 Protein tech。HRP 标记山

羊抗鼠 IgG、HRP 标记山羊抗兔 IgG 均购于 TIANGEN 公司。Cy3 标记山羊抗兔 IgG 购于 Servicebio 公司。

其余试剂同第三章。

#### 2.1.4 常用仪器见附录二

### 2.2 试剂配制

#### 2.2.1 免疫荧光相关试剂

3% $H_2O_2$ : 吸取 300 $\mu$ L  $H_2O_2$  溶液加入到 10mL 去离子水中, 混合均匀。

0.3% Triton-100: 吸取 3 $\mu$ L Triton-100 加入到 10mL PBST 中, 充分混匀。

其他试剂配制同第三章。

### 2.3 实验方法

#### 2.3.1 Tris-Tricine-SDS-PAGE 凝胶电泳

(1) 将玻璃板洗净、晾干、固定(于水平桌面对齐基座)。

(2) Tris-Tricine-SDS-PAGE 凝胶配制:

	分离胶	夹层胶	浓缩胶
	20%/4.5mL	10%/2mL	4%/2mL
49.5%T 3%C	/	0.407mL	0.160mL
49.5%T 6%C	1.82mL	/	/
凝胶缓冲液	1.50mL	0.667mL	0.496mL
50%甘油	0.96mL	/	/
ddH <sub>2</sub> O	0.22mL	0.926mL	1.344mL
10%PAGE 胶凝固剂	40 $\mu$ L	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L
PAGE 胶促凝剂	5 $\mu$ L	3 $\mu$ L	3 $\mu$ L

先将分离胶注入到玻璃板夹层中, 再用蒸馏水封平, 室温放置至分离胶凝固, 去除蒸馏水, 并用滤纸将残留的水尽量吸去。再注入夹层胶并用蒸馏水封平, 室温放置至夹层胶凝固, 去除蒸馏水, 并用滤纸将残留的水尽量吸去。最后注入浓缩胶并用蒸馏水封平, 插入上样梳, 避免气泡产生。

(3) 室温放置至胶凝固, 将胶板放置于电泳槽中, 再将电泳槽放入冰水浴中, 外槽加入 1 $\times$ Tris-tricine-SDS-PAGE 电泳阳极缓冲液, 然后内槽加入电泳阴极缓冲液, 30V 预电泳 10min。拔去上样梳, 用微量加样器加入一定量的蛋白 Marker 和蛋白样品(已加等体积 2 $\times$ Tricine 上样缓冲液于 100 $^{\circ}$ C 煮沸 5min)。

(4) 盖上电泳盖, 在蛋白电泳及转移系统上设置程序: 先 30V 电泳 1h, 再 100V 跑胶至适当位置, 待电泳结束, 撬开玻璃板取出凝胶。

### 2.3.2 Western Blotting

(1) 转膜: 将 SDS-PAGE 电泳后的凝胶裁剪成所需大小, 同时剪切相应大小的 PVDF 膜于无水甲醇中活化 10min。使用镊子按照“滤纸、凝胶、PVDF 膜、滤纸”的顺序于黑板面(负极), 并赶走各层之间的气泡, 放入转印槽中, 加入转膜缓冲液, 四面用冰袋降温, 于 100V 电泳 15min (电泳时间由蛋白大小确定)。

(2) 封闭: 加入一定体积的 3% BSA 浸没 PVDF 膜, 4℃封闭过夜。

(3) 一抗包被: 用 3% BSA 按照 1:1000 的比例稀释特异性一抗, 将上述封闭的 PVDF 膜于 37℃摇床孵育 2h。

(4) 二抗包被: 用 PBST 高转速洗膜 3 遍, 每遍 10min, 再加入用 3% BSA 稀释的二抗溶液 (1:10000), 37℃摇床孵育 1h。

(5) 曝光显色: 用 PBST 高转速洗膜 3 遍, 每遍 10min, 用 1:1 体积混匀的稳定剂和增强剂滴于 PVDF 膜上, 用曝光仪成像。

### 2.3.3 免疫荧光

(1) 将冰冻切片置于室温 30min, 然后加入丙酮浸没切片, 再置于 4℃固定 10min, PBST 洗 3 次每次 5min, 再加入 3% $H_2O_2$  避光处理 10min。

(2) 加入 PBST 洗 3 次每次 5min, 再添加一定体积的 0.3% Triton-100, 摇床慢速透化 15min。

(3) 弃通透液, 加入 PBST 洗 3 次每次 5min, 再加入 5% BSA 浸没爬片, 室温封闭 2h。

(4) 弃封闭液, 加入用 5% BSA 稀释的特异性一抗 (1:1000), 室温孵育 2h。

(5) 弃一抗, PBST 洗 3 次每次 5min, 再加入用 5% BSA 稀释的 Cy3 标记荧光二抗 (1:200), 37℃避光孵育 1h。

(6) 弃二抗, PBST 洗 3 次每次 5min, 再添加 100 $\mu$ L DAPI 溶液 (1:1000), 避光孵育 10min。

(7) 弃 DAPI 溶液, PBST 洗 3 次每次 5min。取出爬片, 细胞面向上于室温避光晾干, 滴加 10 $\mu$ L 防荧光淬灭封片剂于载玻片上, 再将细胞面朝下按压在载玻片上 (防止气泡的产生)。

(8) 避光于徕卡激光扫描共聚焦显微镜下拍照。

### 2.3.4 pIZT-ORF1 载体构建

(1) 根据预测的 ORF1 全长序列设计 PCR 引物序列如下 (表 4-1):

表 4-1 ORF1 的 PCR 引物

Table 4-1 PCR primer for ORF1

引物名称	引物序列(5'-3')	酶切位点
ORF1-F	<u>GAATTC</u> ATGGTCGTGTGGCCATGAA	<i>EcoRI</i>
ORF1-R1	CGTGCCTTGCCTTTGTTTCGCACGCTGTTTCGCCGGTAATTATTA ACTGGATT	
ORF1-R2	<u>CCGCGG</u> CTATGGCCGCTTCTTCGGCTGCGAGCAAAGCGGCTC CGTGCCTTGCCTTIG	<i>SacII</i>

注: 下划线表示酶切位点

(2) 首先以带有 T7 启动子序列的 circRNA\_5655 线性分子载体为模板, 利用上述 ORF1-F 和 ORF1-R1 引物进行 PCR, 胶回收目的条带, 然后以此胶回收产物为模板, 利用 ORF1-F 和 ORF1-R2 引物进行 PCR, 由此获得 ORF1 全长序列。胶回收后, 克隆进 pMD19-T(Simple)载体进行 Sanger 测序验证(测序比对见附录七)。再用 *EcoRI* 和 *SacII* 双酶切, 并克隆进同样双酶切的 pIZT/V5-His 载体, 获得 pIZT-ORF1 载体。最后载体经 *EcoRI* 和 *SacII* 双酶切可切出对应的目的片段, 表明载体已按设计要求构建。

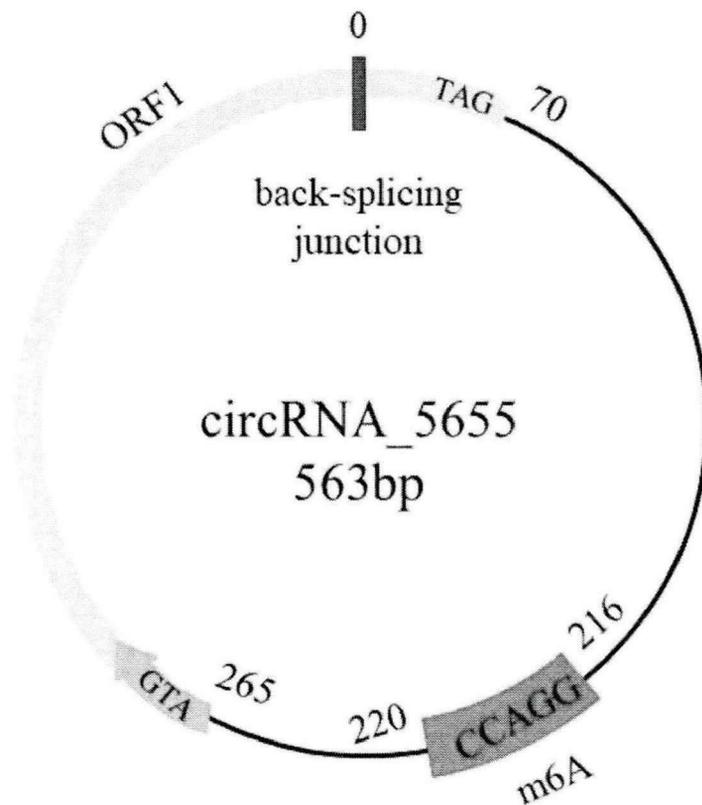
其他实验方法同第三章。

## 3 结果与分析

### 3.1 circRNA\_5655 编码蛋白的潜在性预测及 Western blotting 验证

最新研究表明存在 m6A 修饰位点的 circRNA 能够翻译功能性多肽<sup>[14]</sup>, 为研究 circRNA\_5655 是否具有编码蛋白的潜能, 利用生物信息学方法对 circRNA\_5655 全长序列进行 m6A 修饰位点及开放读码框(ORF)预测。在 circRNA\_5655 上预测到存在 m6A 修饰位点(GGACC), 推测跨 circRNA\_5655 的反向剪接位点存在一个能够编码 122aa 的蛋白(circR-P122)的开放阅读框 ORF1 (如图 4-1), 其中 N 端 99 个氨基酸序列与其亲本基因 histone-lysine N-methyltransferase eggless (LOC101742950) 9-13 外显子的氨基酸序列对应, C 端 23 个氨基酸序列为 circR-P122 特异性序列。为了验证 circRNA\_5655 编码 circR-P122, 委托南京金斯瑞生物科技有限公司人工

合成 circRNA\_5655 编码的蛋白 circR-P122 的接头肽段部分 (RRNSVRTNASARSRFAC), 并根据此抗原肽制备兔源多克隆抗血清 (见附录六)。



ORF1 amino acid sequence:

MVYWAMKNVFPWPVKVRIQDIAPKSTTSAYTTCTVKFDTKTKNPFRTLSARCLAH  
SEPPNARLTIGTRIALFKNTTKSKMENYYSGVVAEIPNPVNNYRRNSVRTNASARSR  
FARSRRRRP

图 4-1 在 circRNA\_5655 上预测的 m6A 修饰位点、ORF 及编码的氨基酸序列

Fig 4-1 The putative m6A site, ORF and its amino acid sequence in circRNA\_5655

为了验证家蚕 circRNA\_5655 能否编码蛋白 circR-P122, 取家蚕中肠组织并裂解蛋白, Tris-Tricine-SDS-PAGE 电泳后使用 Western Blotting 检测 circR-P122 蛋白的表达。结果如图 4-2 所示, 在家蚕中肠组织中检测到了 14kDa 大小的 circR-P122 蛋白, 说明 circRNA\_5655 确实能够编码蛋白。

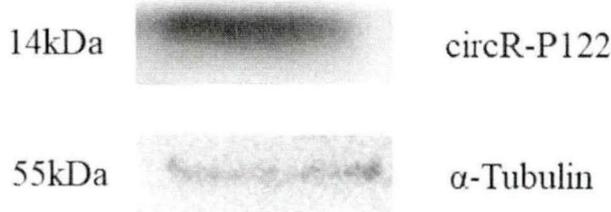


图 4-2 家蚕中肠组织中 circR-P122 蛋白检测

(多肽特异性一抗为 circR-P122 兔抗, 内参一抗为  $\alpha$ -Tubulin 鼠抗, 二抗分别为 HRP 标记山羊抗兔 IgG 和 HRP 标记山羊抗鼠 IgG)

Fig 4-2 Detection of circR-P122 protein in the midgut of silkworm (circR-P122 Rabbit Polyclonal Antibody and alpha Tubulin Mouse McAb are the primary antibody, the second antibody are HRP-labeled Goat Anti-Rabbit IgG and HRP-labeled Goat Anti-mouse IgG)

### 3.2 circRNA\_5655 编码蛋白在 BmN 细胞及家蚕中肠中的免疫荧光定位

将  $2 \times 10^5$  个细胞平铺于 24 孔板的细胞爬片上, 待细胞密度为 70%-80% 且生长状态良好时, 用 1mL 无血清培养基将  $3 \mu\text{g}$  pIZT-LcR-5655 和 pIZT-LcR (阴性对照) 分别转染进 BmN 细胞。用无血清培养基稀释合成的 circR-P122 接头肽至终浓度为  $15 \mu\text{g}/\text{mL}$ , 培养 1h 后弃去旧培养基, 用含血清培养基连续培养 (阳性对照), 48h 后收集细胞做免疫荧光实验。在激光共聚焦显微镜下观察, 我们可以发现 circR-P122 蛋白主要定位于细胞质中 (图 4-3)。

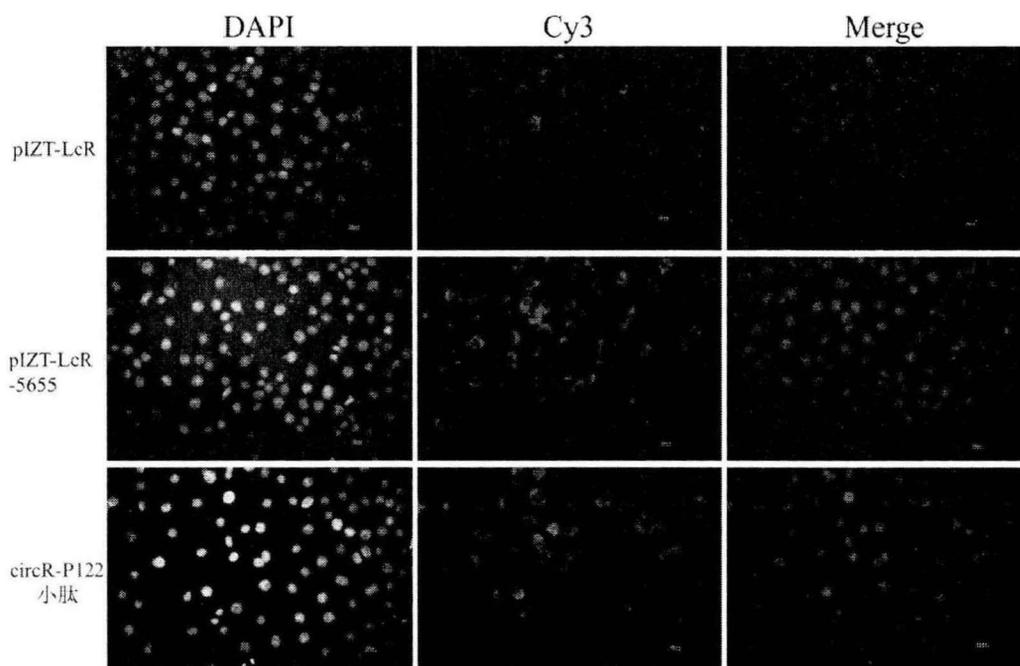


图 4-3 免疫荧光检测 circR-P122 蛋白在 BmN 细胞中的定位

一抗: circR-P122 兔抗; 二抗: Cy3 标记山羊抗兔 IgG; DAPI: 核染料

Fig 4-3 Immunofluorescence detection the location of circR-P122 protein in BmN cells

Primary antibody: circR-P122 Rabbit Polyclonal Antibody; Second antibody:

Cy3-labeled Goat Anti-Rabbit IgG; DAPI: Nuclear dye

家蚕中肠组织的免疫荧光结果如图 4-4 所示, 以未免疫兔血清作为对照, 在用 circR-P122 抗体作为特异性一抗的实验组中检测到了红色荧光, 并且定位于细胞质中。

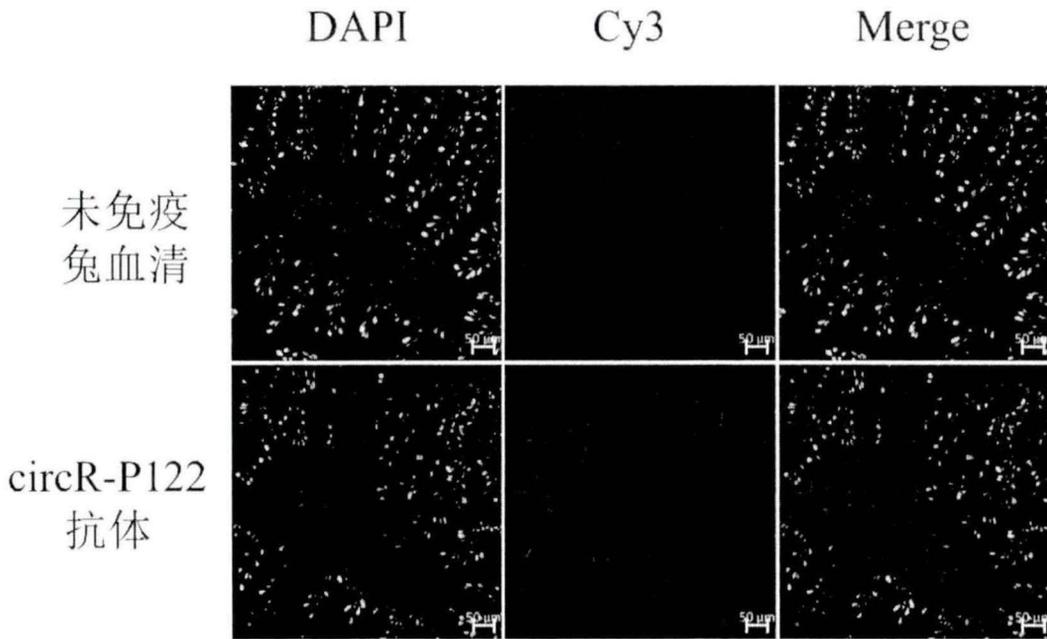


图 4-4 免疫荧光检测 circR-P122 蛋白在家蚕中肠中的定位

一抗: circR-P122 兔抗; 二抗: Cy3 标记山羊抗兔 IgG; DAPI: 核染料

Fig 4-4 Immunofluorescence detection the location of circR-P122 protein in the midgut of silkworm

Primary antibody: circR-P122 Rabbit Polyclonal Antibody; Second antibody: Cy3-labeled Goat Anti-Rabbit IgG; DAPI: Nuclear dye

### 3.3 pIZT-ORF1 载体构建及 circRNA\_5655 编码蛋白对 H3K9me3 的影响

为了探索 circRNA\_5655 编码蛋白的生物学功能, 我们构建了 pIZT-ORF1 载体 (构建方法见本章 2.3.4), 此载体最终经 *EcoRI* 和 *SacII* 双酶切鉴定 (图 4-5)。

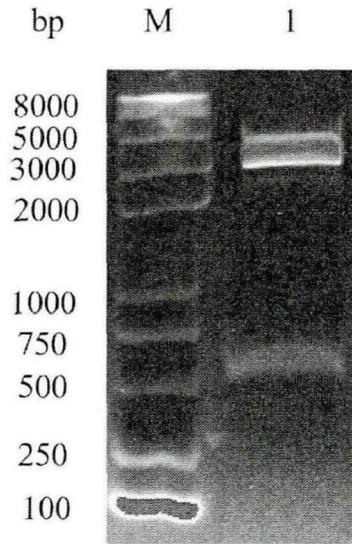


图 4-5 pIZT-ORF1 载体酶切鉴定

M: DNA marker; 1: 重组质粒 pIZT-ORF1 经 *EcoRI/SacII* 双酶切鉴定

Fig 4-5 Enzyme digestion identification of pIZT-ORF1

M: DNA marker; 1: enzyme digestion of recombinant plasmid pIZT-ORF1 by *EcoRI/SacII*

我们从编码 ORF1 的 circRNA\_5655 的来源基因家蚕组蛋白甲基转移酶入手，分别用 1mL 无血清培养基将不同剂量(1 $\mu$ g、2 $\mu$ g、3 $\mu$ g)的 pIZT/V5-His 和 pIZT-ORF1 载体分别转染到  $2 \times 10^8$  个 BmN 细胞中，48h 后利用 Western Blotting 技术检测了过表达 circR-P122 蛋白对 H3K9me3 的影响。结果显示，在 BmN 细胞中能够检测到 15kDa 左右的 H3K9me3 蛋白（图 4-6A），且从灰度扫描结果（图 4-6B）可以看出，相比于空载对照组，转染 1 $\mu$ g、2 $\mu$ g、3 $\mu$ g 的 pIZT-ORF1 载体后，细胞中 H3K9me3 蛋白的表达量显著下调，分别为对照的 1.19 倍、0.59 倍和 0.54 倍，并呈现出一定的剂量依赖性。由此可知，过表达 circR-P122 蛋白抑制了组蛋白 H3K9 发生三甲基化。

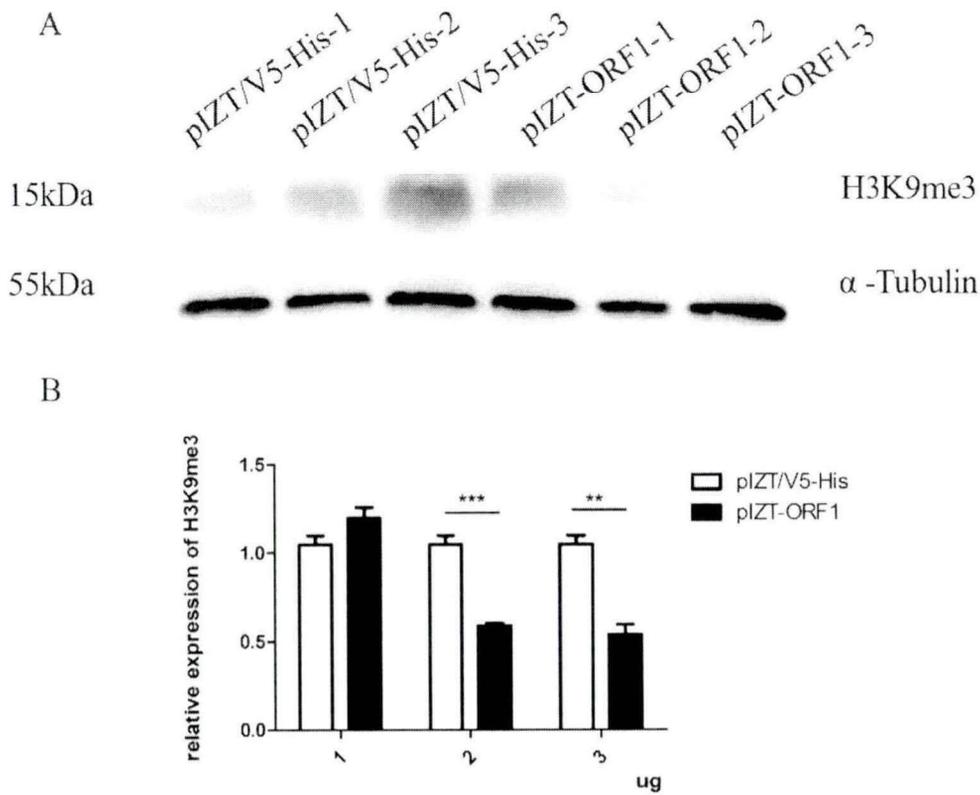


图 4-6 过表达 pIZT-ORF1 对组蛋白甲基化的影响 (\*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ )

A: Western Blotting 检测过表达 pIZT-ORF1 对组蛋白甲基化的影响(pIZT/V5-His-1、-2、-3 分别为转染 1、2、3 $\mu$ g 的 pIZT/V5-His 载体 48h 后收细胞蛋白, pIZT-ORF1-1、-2、-3 分别为转染 1、2、3 $\mu$ g 的 pIZT-ORF1 载体 48h 后收细胞蛋白, 组蛋白甲基化一抗为 H3K9me3 兔抗, 内参一抗为  $\alpha$ -Tubulin 鼠抗, 二抗分别为 HRP 标记山羊抗兔 IgG 和 HRP 标记山羊抗鼠 IgG); B: Western Blotting 条带灰度扫描结果

Fig 4-6 Effect of overexpressing pIZT-ORF1 on histone methylation (\*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ )

A: Effect of overexpressing pIZT-ORF1 on histone methylation with Western blotting test(pIZT/V5-His-1、-2、-3:cells transfected by 1、2、3 $\mu$ g pIZT/V5-His and collected protein after 48h, pIZT-ORF1-1、-2、-3:cells transfected by 1、2、3 $\mu$ g pIZT-ORF1 and collected protein after 48h, H3K9me3 Rabbit Polyclonal Antibody and alpha Tubulin Mouse McAb are the primary antibody, the second antibody are HRP-labeled Goat Anti-Rabbit IgG and HRP-labeled Goat Anti-mouse IgG ); B: Grayscale of Western blotting test

## 4 讨论

circRNA 一直以来被认为是非编码 RNA, 但是最新的研究表明存在 m6A 修饰位点的 circRNA 能够翻译蛋白以发挥功能<sup>[14]</sup>。我们通过生物信息学预测得知 circRNA\_5655 具有 m6A 甲基化修饰位点(GGACC), 并且包含跨 circRNA\_5655 反向剪接位点的开放阅读框 ORF1, 推测其可能编码含有 122 个氨基酸残基的蛋白 circR-P122。

人工合成 circR-P122 蛋白跨 circRNA\_5655 反向剪接位点的接头肽段部分“RRNSVRTNASARSRFAC”并根据此抗原肽制备兔源多克隆抗血清, 使用 Western Blotting 技术在家蚕中肠组织中检测到了 circR-P122 蛋白的表达。

由于 circR-P122 的 N 端的氨基酸序列与其亲本基因 histone-lysine N-methyltransferase eggless (LOC101742950) 第 9-13 外显子的氨基酸序列对应, 因此 circR-P122 可能通过某种方式影响 histone-lysine N-methyltransferase eggless 的功能。我们构建出家蚕 circR-P122 蛋白的表达载体 pIZT-ORF1, 并且 Western Blotting 检测过表达 circR-P122 蛋白对 H3K9me3 蛋白的影响, 结果显示 H3K9me3 蛋白水平有一定程度抑制。已知甲基化的组蛋白是基因活性调节过程的主要参与者, 其与异染色质抑制, 启动子调控和 DNA 甲基化的抑制状态紧密相关<sup>[15]</sup>。我们推测 circR-P122 蛋白可能通过抑制 H3K9me3 的水平在 BmN 细胞周期与细胞凋亡方面起到重要作用, 但其具体的生物学功能还有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] Lasda E , Parker R . Circular RNAs: diversity of form and function[J]. RNA, 2014, 20(12):1829-1842.
- [2] Memczak S , Jens M , Elefsinioti A , et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency[J]. Nature, 2013, 495(7441):333-338.
- [3] Hansen T B , Jensen T I , Clausen B H , et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges[J]. Nature, 2013, 495(7441):384-388.
- [4] Jeck W R, Sharpless N E. Detecting and characterizing circular RNAs[J]. Nature Biotechnology, 2014, 32(5):453-61.
- [5] Guo J U , Agarwal V , Guo H , et al. Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs[J]. Genome Biology, 2014, 15(7).

- [6] Zhang M , Huang N , Yang X , et al. A novel protein encoded by the circular form of the SHPRH gene suppresses glioma tumorigenesis[J]. *Oncogene*, 2018, 37(13).
- [7] Zhang M , Zhao K , Xu X , et al. A peptide encoded by circular form of LINC-PINT suppresses oncogenic transcriptional elongation in glioblastoma[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1).
- [8] Zhang C , Samanta D , Lu H , et al. Hypoxia induces the breast cancer stem cell phenotype by HIF-dependent and ALKBH5-mediated m<sup>6</sup>A-demethylation of NANOG mRNA[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113(14):201602883.
- [9] Lence T , Akhtar J , Bayer M , et al. m<sup>6</sup>A modulates neuronal functions and sex determination in *Drosophila*[J]. *Nature*, 2016.
- [10] Kennedy E M, Bogerd H P, Kornepati A V R, et al. Post-transcriptional m<sup>6</sup>A editing of HIV-1 mRNAs enhances viral gene expression[J]. *Cell Host & Microbe*, 2016, 19(5):675-685.
- [11] Yang D, Qiao J, Wang G, et al. N<sup>6</sup>-Methyladenosine modification of lincRNA 1281 is critically required for mESC differentiation potential[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(Suppl. 1).
- [12] Roundtree I A , Evans M E , Pan T , et al. Dynamic RNA Modifications in Gene Expression Regulation[J]. *Cell*, 2017, 169(7):1187-1200.
- [13] Deng X , Su R , Weng H , et al. RNA N<sup>6</sup>-methyladenosine modification in cancers: current status and perspectives[J]. *Cell Research*, 2018, 28(5):507-517.
- [14] Yang Y, Fan X, Mao M, et al. Extensive translation of circular RNAs driven by N<sup>6</sup>-methyladenosine[J]. *Cell Research*, 2017, 27(5): 626.
- [15] Kouzarides T. Histone methylation in transcriptional control.[J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2002, 12(2):198-209.

## 结 论

### 1. 已取得的成果

(1) 家蚕 circRNA\_5655 能够海绵吸附 bmo-miR-3391-5p 来激活下游靶基因家蚕组蛋白去乙酰化酶 Rpd3、家蚕神经肽受体 A35 基因的表达。

(2) 过表达 circRNA\_5655 能够抑制其亲本基因的表达，促进细胞增殖，抑制细胞凋亡，对 BmCPV 的增殖复制起到反馈调节作用。

(3) circRNA\_5655 能够与一些宿主蛋白互作。

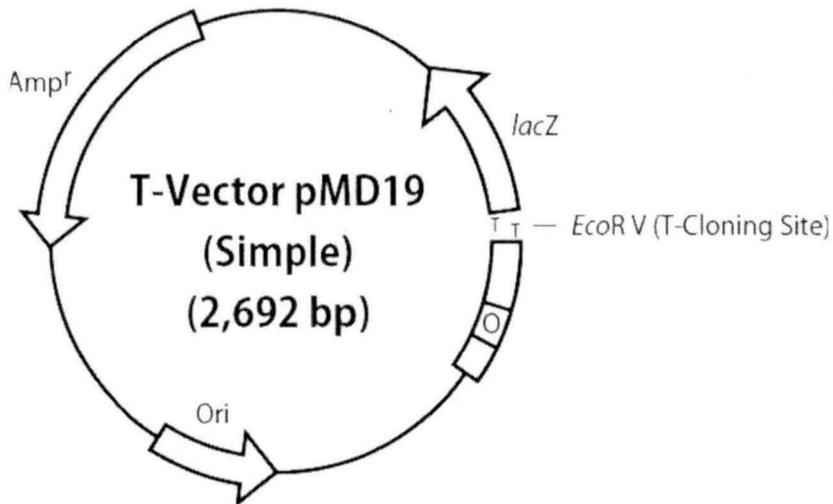
(4) circRNA\_5655 能够编码蛋白 circR-P122，且过表达 circR-P122 蛋白对 H3K9me3 蛋白水平有一定程度抑制。

### 2. 有待进行的研究

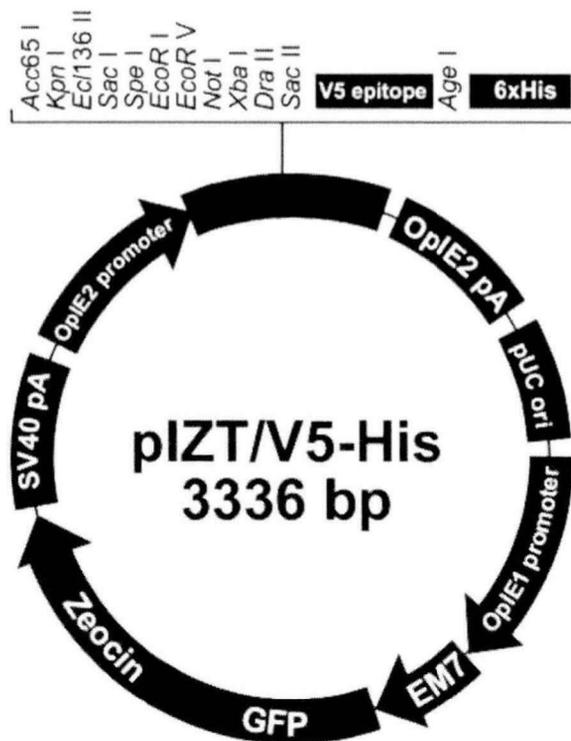
circRNA\_5655 编码蛋白的功能还需要进一步研究。

## 附录一 载体图谱

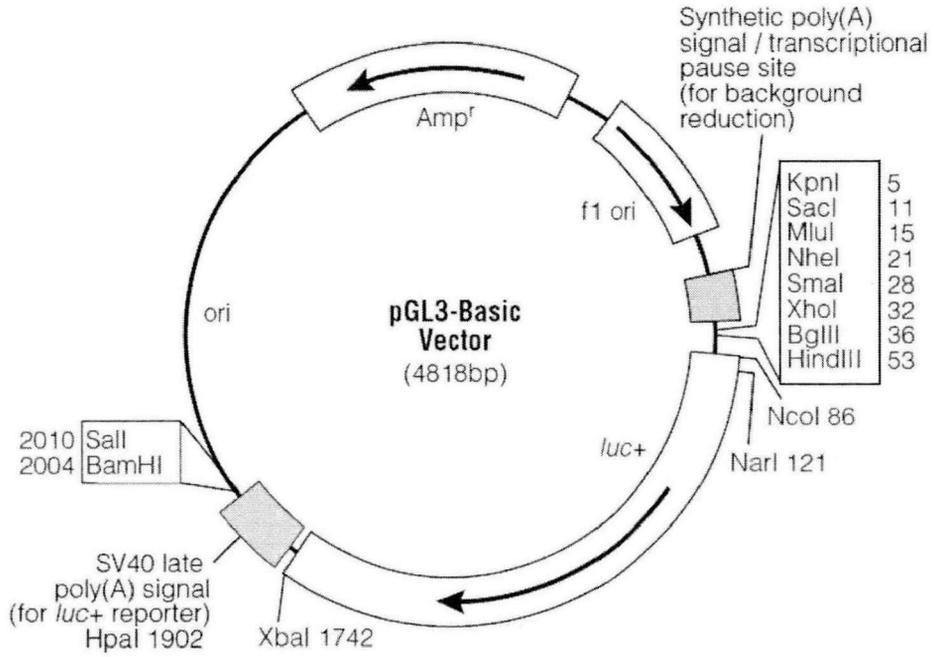
### 1、pMD19-T simple 载体



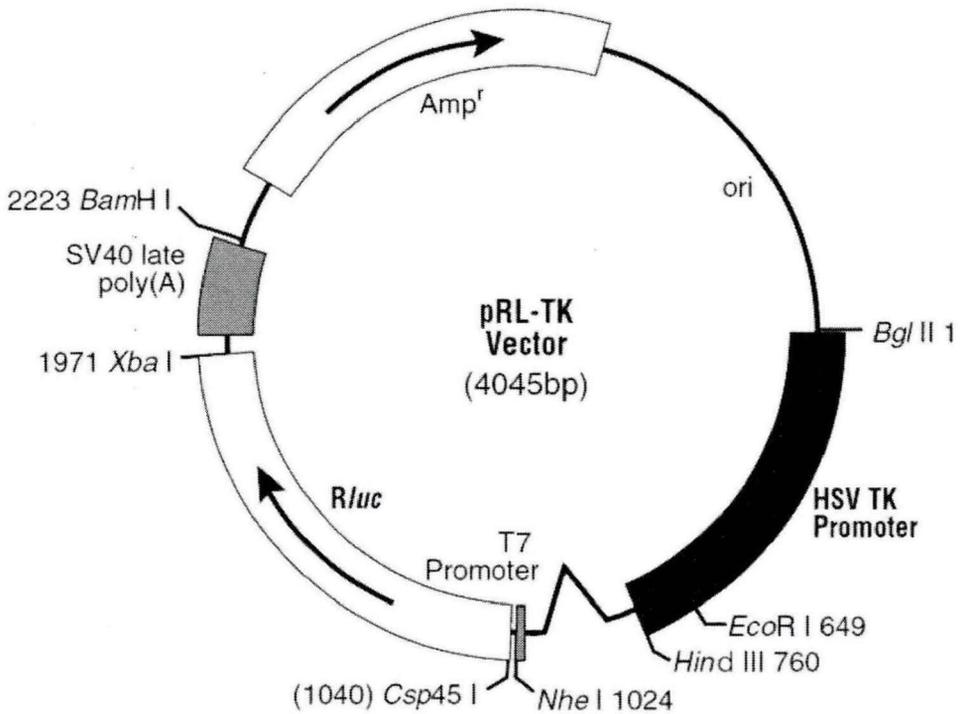
### 2、pIZT/V5-His 载体



3、pGL3 载体



4、pRL-TK 载体



## 附录二 常用仪器

仪器名称	型号	生产公司
PCR 仪	TP600	日本 TaKaRa 公司
1/10000 分析天平	BS124S	北京赛多利斯仪器系统有限公司
pH 计	Delta320	梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司
超声波清洗器	KQ-500DB	昆山市超声仪器有限公司
恒温金属浴	CHB-10	杭州大和热磁电子有限公司
落地式冷冻离心机	CF15D2	日本 Hitachi 公司
台式冷冻离心机	Pico17	美国 Thermo 公司
台式空气恒温振荡器	QYC200	上海福玛实验设备有限公司
超微量分光光度计	NanoDrop-2000	美国 Thermo Fisher 公司
流式细胞仪	FC-500	美国 Beckman Coulter 公司
化学发光仪	Glomax-E6080	美国 Promega 公司
垂直电泳槽	Mini Protean 3 Cell	美国 BioRad 公司
电热鼓风干燥箱	CS101-3EB	重庆四达实验仪器有限公司
生化培养箱	SHP-250	上海精宏实验设备有限公司
可调式恒温摇床	0410006	上海福玛实验设备有限公司
凝胶成像系统	GelDoc XR System	美国 BioRad 公司
超低温冰箱	705	美国 Forma 公司
优普超纯水机	UPT-III-5T	成都超纯科技有限公司
荧光倒置显微镜	Nikon TE2000-U	日本 Nikon 公司
DNA 混合仪	DH- II	杭州新芝公司
荧光定量 PCR 仪	BIO-RAD CFX 96	美国 BIO-RAD 公司
立式高压蒸汽灭菌锅	LDZX-50KB	上海申安医疗器械厂
电热恒温水浴锅	H.H.S	上海医疗器械五厂
加热搅拌器	78-1	江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司
核酸电泳仪	DY-A	上海西巴斯生物技术有限公司
脱色摇床	TS-100	海门市其林贝尔仪器制造有限公司
激光共聚焦显微镜	LSM-800	德国卡尔蔡司公司

## 附录三 体内成环载体构建方案

### 1、体内成环载体 pIZT-LcR 的构建

GGTACCAAACAAGAGAGAATGCTATAGTCGTATAGTATAGTTTCCCGACTATCTGATACCC  
 ATTACTTATCTAGGGGAATGCGAACCCAAAATTTTATCAGTTTCTCGGATATCGATAGAT  
 ATTGGGGAATAAATTTAAATAAATAAATTTGGGCGGGTTAGGGCGTGGCAAAAAGTTT  
 TTTGGCAAATCGCTAGAAATTTACAAGACTTATAAAATTATGAAAAATACAACAAAATTT  
 TAAACACGTGGGCGTGACAGTTTTGGACGGTTTTAGGGCGTTAGAGTAGGCGAGGACAG  
 GGTTACATCGACTAGGCTTTGATCCTGATCAAGAATATATATACTTTATACCGCTTCCTTCT  
 ACATGTTACCTATTTTCAACGAATCTAGTATACCTTTTTACTGTACGATTTATGGGTATAAT  
 AATAAGCTAAATCGAGACTAAGTTTTATTGTTATATATATTTTTTTTATTTTATGCAGAACT  
 AGTCCGCGGTTAATTAAGATCTGGTAACCGAATTCGCGGCCGCATGCATGAGCTCAGCGT  
 AAGTATTCAAATTCCAAATTTTTTACTAGAAATATTCGATTTTTTAAATAGGCAGTTTCTA  
 TACTATTGTATACTATTGTAGATTTCGTTGAAAAGTATGTAACAGGAAGAATAAAGCATTTC  
 CGACCATGTAAAGTATATATATTCTTAATAAGGATCAATAGCCGAGTCGATCTCGCCATGTC  
 CGTCTGTCTTATTATTTATTACCGCCGAGACATCAGGAACTATAAAAAGCTAGAAGGATGA  
 GTTTTAGCATAACAGATTCTAGAGACAAGGACGCAGAGCAAGTTTGTTGATCCATGCTGCC  
 ACGCTTTAACTTTCTCAAATGCCCCAAAAGTCCATGCCCACATTTTTGAACTATTTTCGA  
 AATTTTTTCATAATTGTATTACTCGTGTAATTTCCATCAATTTGCCAAAAAACTTTTTGTC  
 ACGCGTTAACGCCCTAAAGCCGCCAATTTGGTACGCCCACACTATTGAACAATTATCAA  
 ATTTTTTCTCATTTTATTCCTCAATATCTATCGATATCCCCGATTATGAAATTATTAATTTTCG  
 CGTTCGCATTCACACTAGCTGAGTAACGAGTATCTGATAGTTGGGGAAATCGACTACCGG  
 T

注：绿色荧光为果蝇 *laccase2* 内含子 1 的 128-548nt 区域；黄色荧光为多克隆位点：*SpeI*, *SacII*, *PacI*, *BglII*, *BstEII*, *EcoRI*, *NotI*, *NsiI*, *SacI*；灰色为果蝇 *laccase2* 内含子 2 的 1169-1707nt 区域；斜体为 *KpnI* 位点；下划线为 *AgeI* 位点。

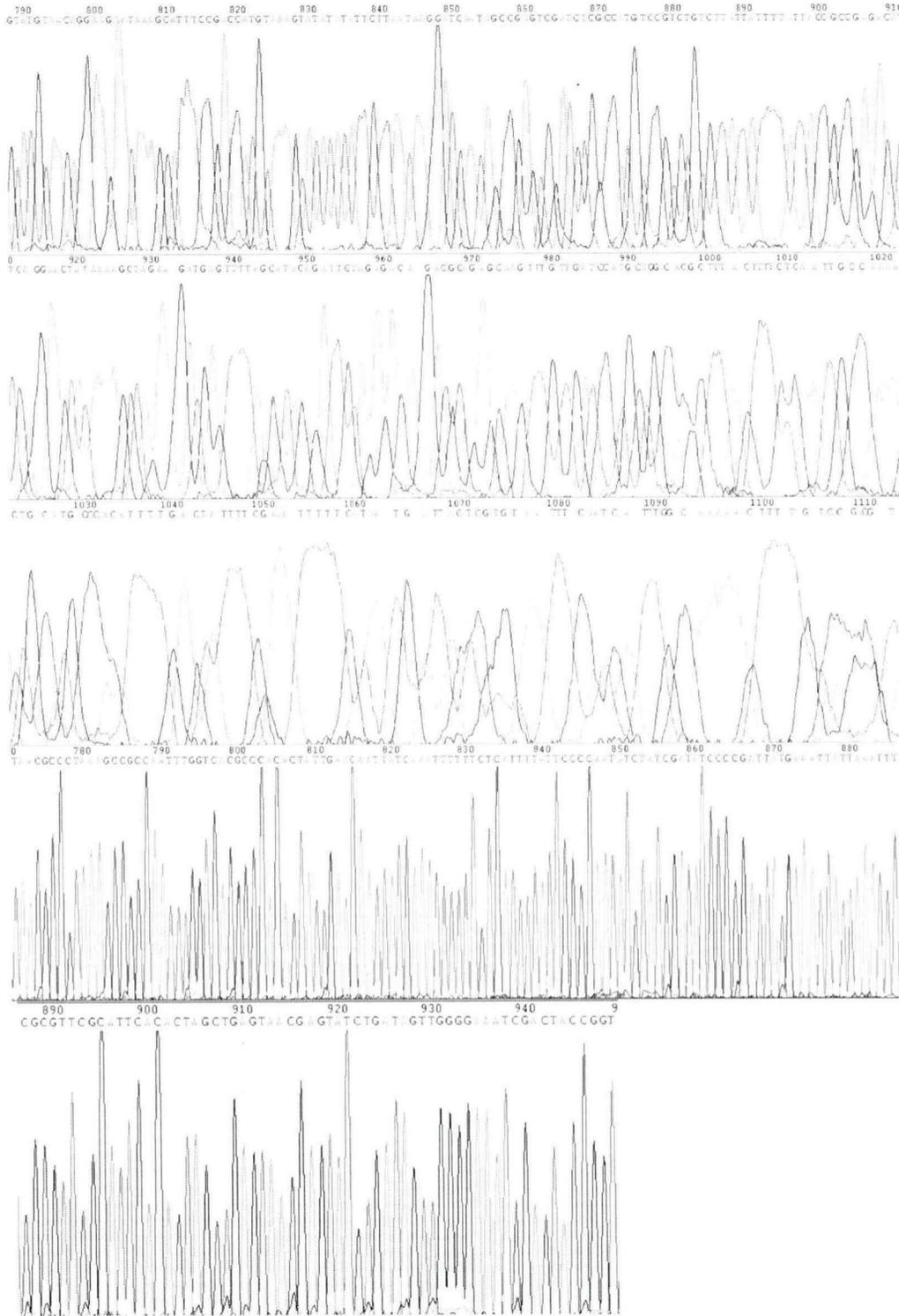
合成上述序列，并克隆进 pIZT-V5/His 的 *KpnI/AgeI* 位点，完成载体构建。

### 2、体内成环载体 pIZT-LcR-5655 的构建

GGTACCAAACAAGAGAGAATGCTATAGTCGTATAGTATAGTTTCCCGACTATCTGATACCC  
 ATTACTTATCTAGGGGAATGCGAACCCAAAATTTTATCAGTTTCTCGGATATCGATAGAT  
 ATTGGGGAATAAATTTAAATAAATAAATTTGGGCGGGTTAGGGCGTGGCAAAAAGTTT  
 TTTGGCAAATCGCTAGAAATTTACAAGACTTATAAAATTATGAAAAATACAACAAAATTT  
 TAAACACGTGGGCGTGACAGTTTTGGACGGTTTTAGGGCGTTAGAGTAGGCGAGGACAG  
 GGTTACATCGACTAGGCTTTGATCCTGATCAAGAATATATATACTTTATACCGCTTCCTTCT  
 ACATGTTACCTATTTTCAACGAATCTAGTATACCTTTTTACTGTACGATTTATGGGTATAAT  
 AATAAGCTAAATCGAGACTAAGTTTTATTGTTATATATATTTTTTTTATTTTATGCAGGCGAA  
 ACAGCGTGCGAACAACGCAAGCGCACGGAGCCGCTTTGCTCGCAGCCGAAGAAGGCG  
 GCCATAGCGCTGGGGTACGCCCGCTTGACGGAGACCACGCGCAGCCGGACGTGACCCA  
 GGAGAAGACCCCAATAGAAACAGCACCCAACGAGTCAAGGAAGATGACAGGGAGGTG  
 TCTGTCTCAGTTGTCGGCGGAGGTGGCGCCGCGGACCTCCCCCGCCCGGGGAGCT  
 GGTGCGGCCGCCCTCAAGCCGGGCATGGTCTGTGGGCCATGAAGAAGTCTTCTCCC  
 CCTGGGTGAAGGTCAGGATACAGGACATCGCGCCAAAGTTCGACCACAAGCGCGTACAC  
 GACCTGCACTGTCAAGTTTGACACGAAAACGAAAAACCCGTTCAAGGACCCTGAGTGCG  
 AGGTGTCTCGCGCATTTCGGAGCCGCCAAACGCGAGACTCACTATAGGTACGCGAATAATA  
 GCTTTATTCAAGAATACCACTAAGAGCAAAATGGAGAATTACTACTCGGGTGTCGTTGCC  
 GAAATACCGAATCCAGTTAATAATTACCGGTAAGTATTCAAATTCCAAATTTTTTACTA  
 GAAATATTCGATTTTTTAAATAGGCAGTTTCTATACTATTGTATACTATTGTAGATTTCGTTGAA







## 附录四 RT-qPCR 原始数据

表 1 家蚕 circRNAs 表达量验证 (n=3)

circRNA	来源	Ct- TIF-4A	Ct- circRNA	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
circRNA_1193	正常中肠	23.60,22.93,20.72	31.30,31.22,30.43	1.00
	BmCPV 感染中肠	27.84,25.89,25.5	31.39,31.02,30.80	15.98
circRNA_2439	正常中肠	23.60,22.93,23.30	30.12,30.30,29.17	1.00
	BmCPV 感染中肠	25.50,25.89,23.50	28.12,30.03,29.28	8.47
circRNA_5655	正常中肠	23.60,22.98,27.84	29.18,26.61,31.09	1.00
	BmCPV 感染中肠	21.76,21.15,25.5	25.56,23.34,27.23	3.07
circRNA_6031	正常中肠	23.60,22.98,24.11	30.60,29.91,27.99	1.00
	BmCPV 感染中肠	24.08,23.46,27.84	27.99,30.18,30.49	3.86
circRNA_0962	正常中肠	22.93,22.59,22.81	30.7,26.76,34.20	1.00
	BmCPV 感染中肠	20.55,21.58,23.14	27.67,24.75,30.68	5.99

表 2 circRNA\_5655 在 5 龄 3 天家蚕不同组织中的表达模式 (n=3)

组织	Ct- TIF-4A	Ct- circRNA_5655	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
性腺	21.80,21.35,16.44	24.23,23.88,20.48	12.30
丝腺	23.73,20.67,21.22	28.61,31.45,31.53	0.27
马氏管	23.08,22.20,20.06	25.82,24.20,21.43	23.79
头	24.34,18.05,18.16	24.75,19.02,19.90	40.41
脂肪体	23.56,23.35,17.49	27.84,30.74,23.62	1.00
中肠	24.18,23.15,22.89	28.36,30.92,26.59	2.41
皮肤	23.68,20.59,21.04	33.41,30.66,30.11	0.27
蚕血	21.81,21.81,22.34	30.48,30.48,30.58	0.12

表 3 circRNA\_6031 在 5 龄 3 天家蚕不同组织中的表达模式 (n=3)

组织	Ct- TIF-4A	Ct- circRNA_6031	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
性腺	21.35,20.59,21.62	28.19,23.57,24.37	1.00
丝腺	23.08,18.19,18.19	28.20,19.71,19.76	2.77
马氏管	25.56,22.46,20.35	31.16,26.32,27.10	0.99
头	26.40,17.31,17.31	32.09,19.94,20.03	1.51

脂肪体	27.05,21.26,21.26	32.55,24.70,24.73	1.29
中肠	24.18,24.33,20.98	30.20,31.70,22.71	1.28

表 4 circRNA\_0962 在 5 龄 3 天家蚕不同组织中的表达模式 (n=3)

组织	Ct- TIF-4A	Ct- circRNA_0962	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
性腺	20.35,20.59,20.59	32.98,33.14,32.88	0.93
丝腺	21.62,18.19,18.19	32.89,34.05,33.83	0.20
马氏管	22.20,22.46,17.31	30.71,34.27,30.40	1.73
头	23.76,24.34,22.46	31.08,33.93,31.42	9.62
脂肪体	23.56,21.16,21.16	33.24,34.07,33.90	1.00
中肠	23.15,20.98,20.98	30.83,31.95,32.52	3.38

表 5 circ RNA\_5655 在家蚕中肠不同发育阶段的表达模式 (n=3)

龄期	Ct- TIF-4A	Ct- circRNA_5655	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
2 龄 3 天	20.91,22.76,22.69	24.27,26.89,26.16	15.73
3 龄 3 天	20.94,21.09,21.69	28.35,28.22,29.66	1.00
4 龄 4 天	21.09,23.02,23.15	28.99,29.25,30.92	1.25
5 龄 3 天	24.18,24.35,22.86	28.36,27.42,25.60	21.20

表 6 circ RNA\_6031 在家蚕中肠不同发育阶段的表达模式 (n=3)

龄期	Ct- TIF-4A	Ct- circRNA_6031	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
2 龄 3 天	20.91,24.53,24.53	28.78,27.68,24.86	1.00
3 龄 3 天	20.94,24.33,21.67	31.20,31.70,23.79	0.18
4 龄 4 天	21.09,23.02,23.29	28.70,29.22,25.89	0.51
5 龄 3 天	24.18,21.67,20.98	30.20,23.26,22.71	2.31

表 7 circ RNA\_0962 在家蚕中肠不同发育阶段的表达模式 (n=3)

龄期	Ct-TIF-4A	Ct- circRNA_0962	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
2 龄 3 天	23.73,24.53,24.53	30.32,32.47,32.77	6.72
3 龄 3 天	24.34,21.67,21.67	31.05,32.52,32.21	1.68
4 龄 4 天	23.02,23.29,23.29	29.79,33.02,34.20	1.93
5 龄 3 天	23.15,20.98,20.98	30.83,31.95,32.52	1.00

表 8 circRNA\_5655 在正常中肠及 BmCPV 感染中肠中的表达模式 (n=3)

时间 (天)	来源	Ct- TIF-4A	Ct- circRNA_5655	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
1	正常中肠	24.08,23.40,17.60	29.16,27.81,20.17	1.00
	BmCPV 感染中肠	23.26,23.87,24.02	27.24,25.90,25.38	3.22
2	正常中肠	23.46,23.59,17.80	29.06,28.80,20.79	1.00
	BmCPV 感染中肠	23.72,25.08,23.04	28.04,26.53,25.40	5.84
3	正常中肠	20.55,24.07,24.39	27.34,27.62,27.78	1.00
	BmCPV 感染中肠	19.92,26.17,24.05	26.19,29.25,26.91	1.42
4	正常中肠	19.68,19.28,22.55	27.47,25.77,26.41	1.00
	BmCPV 感染中肠	16.77,17.38,25.05	22.32,21.97,28.05	3.42
5	正常中肠	23.63,23.55,23.86	28.18,27.93,28.42	1.00
	BmCPV 感染中肠	24.20,24.90,22.07	27.57,25.75,26.08	5.09
6	正常中肠	19.10,24.56,22.08	25.51,27.96,26.40	1.00
	BmCPV 感染中肠	23.61,23.61,23.68	26.97,26.86,27.42	3.63
7	正常中肠	20.83,21.93,22.76	28.24,26.34,29.31	1.00
	BmCPV 感染中肠	21.43,22.91,22.22	27.56,26.76,26.90	2.52
8	正常中肠	22.08,24.12,23.41	27.64,27.08,26.51	1.00
	BmCPV 感染中肠	17.93,25.69,25.69	23.08,27.20,27.29	2.30
9	正常中肠	22.27,23.40,17.87	27.52,28.05,24.32	1.00
	BmCPV 感染中肠	21.76,23.25,23.17	25.56,27.43,27.42	2.90
10	正常中肠	20.66,21.65,21.75	26.20,27.37,27.26	1.00
	BmCPV 感染中肠	22.84,21.77,22.20	27.62,23.92,25.03	6.66
11	正常中肠	21.33,16.74,21.89	27.12,22.42,27.27	1.00
	BmCPV 感染中肠	21.15,23.76,16.89	23.24,27.53,21.82	6.04
12	正常中肠	22.98,22.89,19.34	26.61,26.59,25.83	1.00
	BmCPV 感染中肠	21.58,22.59,22.48	22.77,23.46,25.26	8.54

表 9 circRNA\_5655 体内成环载体转染 BmN 细胞 48h 后的表达量 (n=3)

质粒量	种类	Ct-Tif4a	Ct- circRNA_5655	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
1 $\mu$ g	PIZT-LcR	12.75,20.2,19.89	25.23,31.97,31.81	1.00
	PIZT-LcR-5655	12.58,17.34,17.45	18.79,22.40,22.92	89.97
2 $\mu$ g	PIZT-LcR	18.86,19.19,14.67	30.82,32.78,26.05	1.00
	PIZT-LcR-5655	13.85,15.27,12.91	16.88,20.39,15.32	447.93

3μg	PIZT-LcR	14.59,18.90,14.85	25.31,32.01,26.38	1.00
	PIZT-LcR-5655	13.51,18.66,11.02	13.89,20.35,12.24	1661.42

表 10 过表达 circRNA\_5655 对其亲本基因的影响 (n=3)

质粒量	种类	Ct-Tif4a	Ct- host gene	2 <sup>-ΔΔCt</sup>
1μg	PIZT-LcR	12.75,20.20,19.89	23.33,27.93,26.95	1.00
	PIZT-LcR-5655	12.58,17.34,17.45	23.10,26.55,25.88	0.60
2μg	PIZT-LcR	18.86,19.19,14.67	26.30,26.53,23.54	1.00
	PIZT-LcR-5655	13.85,15.27,12.91	24.50,23.36,23.09	0.37
3μg	PIZT-LcR	14.59,18.90,14.85	21.24,26.80,24.07	1.00
	PIZT-LcR-5655	13.51,18.66,11.02	21.92,27.51,22.76	0.33

表 11 过表达 circRNA\_5655 对宿主免疫凋亡基因的影响 (n=3)

基因	载体种类	Ct-Tif4a	Ct-对应 mRNA	2 <sup>-ΔΔCt</sup>
APA	PIZT-LcR	14.59,18.90,14.85	23.67,26.64,22.65	1.00
	PIZT-LcR-5655	13.51,18.66,11.02	22.66,26.23,21.34	0.75
SPZ	PIZT-LcR	14.59,18.90,14.85	22.84,27.00,22.57	1.00
	PIZT-LcR-5655	13.51,18.66,11.02	22.38,26.40,21.37	0.70
P53	PIZT-LcR	14.59,18.90,14.85	20.87,24.90,21.69	1.00
	PIZT-LcR-5655	13.51,18.66,11.02	20.58,25.04,17.94	0.77
STAT	PIZT-LcR	14.59,18.90,14.85	17.61,23.34,18.93	1.00
	PIZT-LcR-5655	13.51,18.66,11.02	17.93,23.23,18.16	0.47
SUR	PIZT-LcR	14.59,18.90,14.59	19.57,23.53,19.39	1.00
	PIZT-LcR-5655	13.51,18.66, 13.51	18.95,23.61,19.05	0.71

表 12 过表达 circRNA\_5655 对 BmCPV VP1 基因表达水平的影响 (n=3)

质粒量	种类	Ct-Tif4a	Ct- BmCPV S1	2 <sup>-ΔΔCt</sup>
1μg	PIZT-LcR	21.08,23.22,22.17	30.46,28.59,31.22	1.00
	PIZT-LcR-5655	20.62,22.15,21.34	30.44,27.05,30.81	0.96
2μg	PIZT-LcR	20.85,21.01,20.86	30.13,30.04,29.91	1.00
	PIZT-LcR-5655	20.43,20.07,20.01	29.48,29.10,29.15	1.04
3μg	PIZT-LcR	19.95,19.81,19.78	28.98,28.79,28.71	1.00
	PIZT-LcR-5655	20.66,20.68,20.43	29.60,29.56,29.42	1.03

表 13 过表达 circRNA\_5655 对 BmCPV VP7 基因表达水平的影响 (n=3)

质粒量	种类	Ct-Tif4a	Ct- BmCPV S7	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
1 $\mu$ g	PIZT-LcR	21.08,21.10,20.92	30.03,29.83,29.58	1.00
	PIZT-LcR-5655	20.62,20.29,20.21	30.11,29.94,29.95	0.56
2 $\mu$ g	PIZT-LcR	20.85,21.01,20.86	30.04,29.78,29.73	1.00
	PIZT-LcR-5655	20.43,20.07,20.01	29.81,29.55,29.39	0.73
3 $\mu$ g	PIZT-LcR	19.95,19.81,19.78	29.31,29.12,28.94	1.00
	PIZT-LcR-5655	20.66,20.68,20.43	29.30,29.48,29.16	1.47

## 附录五 双荧光素酶报告系统原始数据

表 14 circRNA\_5655 作用于 bmo-miR-3391-5p 对靶基因的影响 (n=3)

	萤火虫荧光素酶活/海肾荧光素酶活
Luc-mut-EV-1 $\mu$ g	0.2357, 0.1317, 0.2291
Luc-mut-EV-2 $\mu$ g	0.1317, 0.2754, 0.2291
Luc-mut-EV-3 $\mu$ g	0.2357, 0.4042, 0.4819
Luc-mut-circRNA_5655-1 $\mu$ g	0.2000, 0.1920, 0.2380
Luc-mut- circRNA_5655-2 $\mu$ g	0.1900, 0.2296, 0.2122
Luc-mut- circRNA_5655-3 $\mu$ g	0.4600, 0.3400, 0.3352
Luc-A35-EV-1 $\mu$ g	0.9459, 1.0712, 1.2382
Luc-A35-EV-2 $\mu$ g	1.8038, 1.4716, 1.5077
Luc-A35-EV-3 $\mu$ g	0.9048, 1.3563, 0.8491
Luc-A35-circRNA_5655-1 $\mu$ g	0.7533, 0.5966, 0.6639
Luc-A35-circRNA_5655-2 $\mu$ g	1.2861, 1.0746, 0.9455
Luc-A35-circRNA_5655-3 $\mu$ g	1.3127, 1.5927, 1.3211
Luc-Rpd3-EV-1 $\mu$ g	0.9287, 1.0850, 1.1150
Luc-Rpd3-EV-2 $\mu$ g	1.3528, 1.2272, 1.0756
Luc-Rpd3-EV-3 $\mu$ g	1.4245, 1.4851, 1.4156
Luc-Rpd3-circRNA_5655-1 $\mu$ g	0.7898, 1.1591, 1.4148
Luc-Rpd3-circRNA_5655-2 $\mu$ g	1.6011, 1.7713, 1.6705
Luc-Rpd3-circRNA_5655-3 $\mu$ g	2.3847, 2.2486, 2.6841

注: EV 表示成环空载, circRNA\_5655 表示 circRNA\_5655 成环表达载体。

## 附录六 抗原肽合成及抗体效价

> circRNA\_5655 核酸序列

GCGAAACAGCGTGCGAACAAACGCAAGCGCACGGAGCCGCTTTGCTCGCAGCCGAAGA  
AGGCGGCCATAGCGCTGGGGTACGCCCGCTTGACGGAGACCACGCGCAGCCGGACGT  
GACCCAGGAGAAGACCCCAATAGAAACAGCACCCAACGAGTCGAAGGAAGATGACAGG  
GAGGTGTCTGTCTGTTCAAGTTGTCGGCGGAGGTGGCGCCGCCGGACCTCCCCCGCCCGG  
GGAGCTGGTGCGGCCGCCCTCAAGCCGGGCATGGTCTGTGGGCCATGAAGAACGTCT  
TCTCCCCCTGGGTGAAGGTCAGGATACAGGACATCGCGCCAAAGTCGACCACAAGCGCG  
TACACGACCTGCACTGTCAAGTTTGACACGAAAACGAAAACCCGTTCAAGACCCTGAG  
TGCGAGGTGTCTCGCGCATTCGGAGCCGCCAACGCGGAGACTCACTATAGGTACGCGAA  
TAATAGCTTTATTCAAGAATACCACTAAGAGCAAAATGGAGAATTACTACTCGGGTGTCTGT  
TGCCGAAATACCGAATCCAGTTAATAATTACCG

（注：文本框处为预测的 m6A 修饰位点，划线处为预测的开放阅读框）

推测上述序列文本框处（GGACC）可能为 m6A 修饰位点，据此进行编码蛋白预测：

>|cl|ORF1 实际编码的蛋白 circR-P122 的氨基酸序列

MVVWAMKNVFPWVKVRIQDIAPKSTTSAYTTCTVKFDTKTKNPFRTLSA  
RCLAHSEPPNARLTIGTRIIALFKNTTKSKMENYYSGVVAEIPNPVNNYRRNSVR  
TNASARSRFARSRRRP

（注：文本框处为 circRNA\_5655 编码的特异性序列，划线处与 circRNA\_5655 线性基因编码的序列一致）

人工合成跨 circRNA\_5655 的反向剪接位点的 circR-P122 蛋白的接头肽段部分“RRNSVRTNASARSRFAC”，并根据此抗原肽制备兔源多克隆抗血清。

表 12 抗原肽的氨基酸序列

名称	氨基酸序列 (N→C)
circR-P122	RRNSVRTNASARSRFAC

表 13 小肽抗体 ELISA 效价

Animal / Dilution	#8395	#8396	#8395	#8396

NC	1:1000	0.079	0.073	/	/
1	1:1000	3.191	3.198	3.086	3.196
2	1:2000	2.967	3.027	2.880	3.002
3	1:4000	2.872	2.961	2.817	3.014
4	1:8000	2.707	2.903	2.658	2.833
5	1:16000	2.428	2.698	2.372	2.741
6	1:32000	1.946	2.535	2.014	2.529
7	1:64000	1.451	2.091	1.465	2.058
8	1:128000	0.844	1.592	0.845	1.433
9	1:256000	0.422	0.959	0.453	0.830
10	1:512000	0.248	0.524	0.296	0.517
11	Blank	0.066	0.082	0.081	0.068
	Titer	1:512000	>1:512000	1:512000	>1:512000
	Sample	Production bleed	Production bleed	Final antiserum	Final antiserum

## 附录七 测序原始结果

### 1、T7 启动子体外转录成环的测序 BLAST 结果

#### (1) circRNA\_5655 全长序列比对

Range 1: 1 to 563 [Graphics](#)

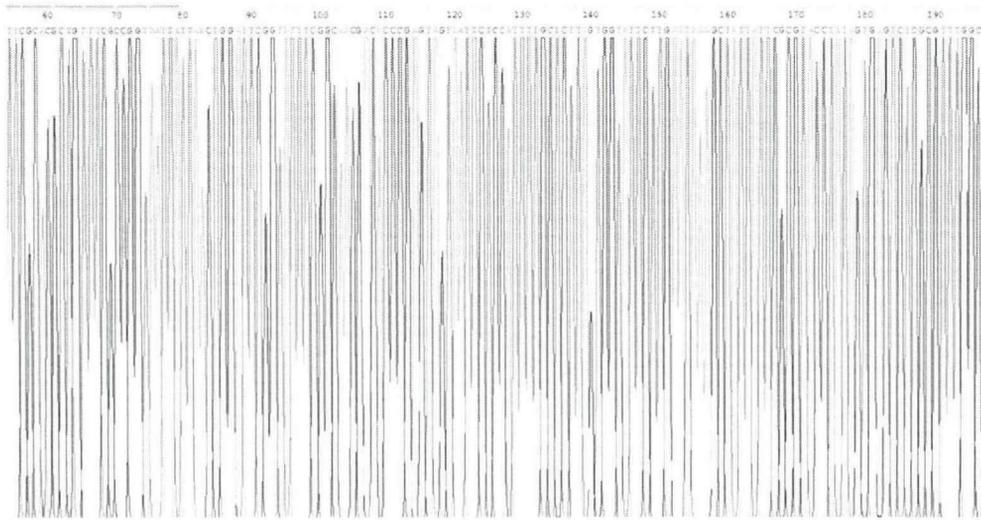
Score	Expect	Identities	Gaps
1018 bits(551)	0.0	559/563(99%)	0/563(0%)
Query 88	GCGAAACAGCGTGCGAACAAACGCAAGCCACGGAGCCGCTTTGCTCGCAGCCGAAGAAG	127	
Sbjct 1	GCGAAACAGCGTGCGAACAAACGCAAGCCACGGAGCCGCTTTGCTCGCAGCCGAAGAAG	60	
Query 128	GCGGCCATAGCGCTCGGGTACGCCCGCTCGADGGAGACCACGCGCAGCCGGADGTGACC	187	
Sbjct 61	GCGGCCATAGCGCTCGGGTACGCCCGCTCGADGGAGACCACGCGCAGCCGGADGTGACC	120	
Query 188	CAGGAGAAGACCCCAATAGAAACAGCACCCAACGAGTCGAAGGAAGATGACAGGGAGGTG	247	
Sbjct 121	CAGGAGAAGACCCCAATAGAAACAGCACCCAACGAGTCGAAGGAAGATGACAGGGAGGTG	180	
Query 248	TCTGTCGTCAGTTGTCGGCGGAGGTGGCGCCGCCGGACTCCCCCGCCCGGGGAGCTG	307	
Sbjct 181	TCTGTCGTCAGTTGTCGGCGGAGGTGGCGCCGCCGGACTCCCCCGCCCGGGGAGCTG	240	
Query 308	GTGCGGCCGCCCTCAAGCCGGGCATGGTCGTGTGGCCATGAAGAACGTCTTCTCCCC	367	
Sbjct 241	GTGCGGCCGCCCTCAAGCCGGGCATGGTCGTGTGGCCATGAAGAACGTCTTCTCCCC	300	
Query 368	TGGGTGAAGGTCAGGATACAGGACATCGCGCCAAAGTCGACCACAAGCGCTACACGACC	427	
Sbjct 301	TGGGTGAAGGTCAGGATACAGGACATCGCGCCAAAGTCGACCACAAGCGCTACACGACC	360	
Query 428	TGTAAGTCAAGTTTGACACGAAAACGAAAACCCGTTTCAGGACCTGAGTGCAGGGTGC	487	
Sbjct 361	TGCACTGTCAAGTTTGACACGAAAACGAAAACCCGTTTCAGGACCTGAGTGCAGGGTGT	420	
Query 488	CTCGGCATTTCGGAGCCGCCAAACGCGAGACTACTATAGGTACGCGAATAATAGCTTTA	547	
Sbjct 421	CTCGGCATTTCGGAGCCGCCAAACGCGAGACTACTATAGGTACGCGAATAATAGCTTTA	480	
Query 548	TTCAAGAATACCACTAAGAGCAAAATGGAGAATTACTACTCGGGTGTGCTTCCCGAAATA	607	
Sbjct 481	TTCAAGAATACCACTAAGAGCAAAATGGAGAATTACTACTCGGGTGTGCTTCCCGAAATA	540	
Query 608	CCGAATCCAGTTAATAATTACCG	630	
Sbjct 541	CCGAATCCAGTTAATAATTACCG	563	

#### (2) circRNA\_5655 接头序列比对

Range 1: 1 to 143 [Graphics](#)

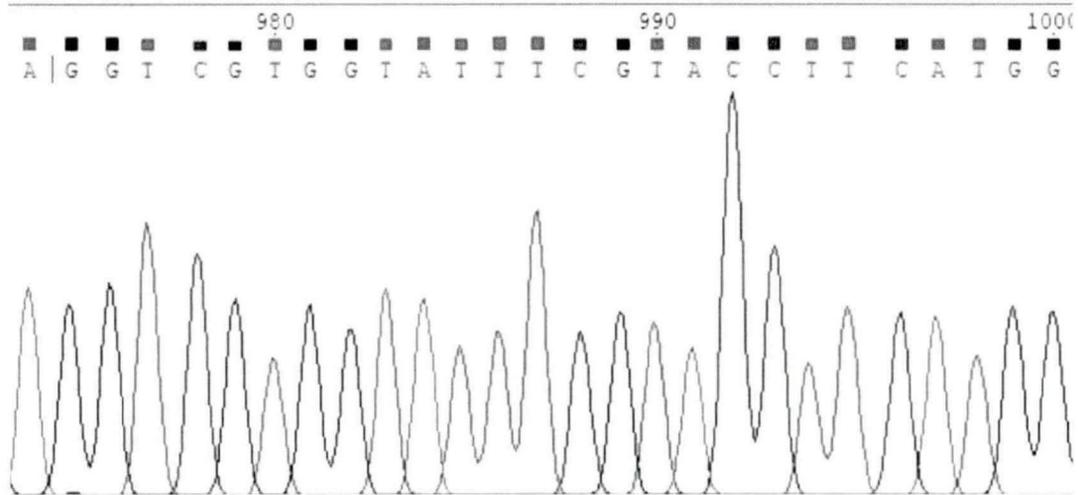
Score	Expect	Identities	Gaps
265 bits(143)	2e-75	143/143(100%)	0/143(0%)
Query 54	ITCGCACGCTGTTTCGCCGTAATTATAACTGGATTCCGATTTCGGCAACGACACCCG	113	
Sbjct 143	ITCGCACGCTGTTTCGCCGTAATTATAACTGGATTCCGATTTCGGCAACGACACCCG	84	
Query 114	AGTAGTAATTTCCTCAATTTGCTCTTAGTGGTATTCTTGAATAAAGCTAATTATCCGCTAC	173	
Sbjct 83	AGTAGTAATTTCCTCAATTTGCTCTTAGTGGTATTCTTGAATAAAGCTAATTATCCGCTAC	24	
Query 174	CTATAGTGAGTCTCGCGTTTGGC	196	
Sbjct 23	CTATAGTGAGTCTCGCGTTTGGC	1	

2、无缝克隆的 circRNA\_5655 体内成环载体接头序列测序验证 (100%)



3、circRNA\_5655 Pull Down 的 bmo-miR-3391-5p 测序峰图 (100%)

bmo-miR-3391-5p 的序列为: AGGUCGUGGUAUUUCGUACCUUCAUGG



4、ORF1 序列克隆进 pMD19-T (simple) 载体的测序 BLAST 结果

Range 1: 1 to 369		<a href="#">Graphics</a>		<a href="#">▼</a> Next
Score	Expect	Identities	Gaps	
665 bits(360)	0.0	366/369(99%)	0/369(0%)	
Query 154	ATGGTCGTGTGGGCCATGAAGAACGTCTTCTCCCCCTGGGTGAAGGTCAGGATACAGGAC			213
Sbjct 1	ATGGTCGTGTGGGCCATGAAGAACGTCTTCTCCCCCTGGGTGAAGGTCAGGATACAGGAC			60
Query 214	ATCGCGCCAAAGTCGACCACAAGCGGTGCACGACCTGCACTGTCAAGTTTGACACGAAA			273
Sbjct 61	ATCGCGCCAAAGTCGACCACAAGCGGTGCACGACCTGCACTGTCAAGTTTGACACGAAA			120
Query 274	ACGAAAAACCCGTTTCAGGACCCTGAGTGCAGGTCCTCGGCATTTCGGAGCCGCCAAAC			333
Sbjct 121	ACGAAAAACCCGTTTCAGGACCCTGAGTGCAGGTCCTCGGCATTTCGGAGCCGCCAAAC			180
Query 334	GCGAGACTCACTATAGGTACGCGAATAATAGCTTTATTCAAGAATACCACTAAGAGCAAA			393
Sbjct 181	GCGAGACTCACTATAGGTACGCGAATAATAGCTTTATTCAAGAATACCACTAAGAGCAAA			240
Query 394	ATGGAGAATTACTACTCGGGTGTTCGTTGCCGAAATACCGAATCCAGTTAATAATTACCGG			453
Sbjct 241	ATGGAGAATTACTACTCGGGTGTTCGTTGCCGAAATACCGAATCCAGTTAATAATTACCGG			300
Query 454	TGAAACAGCGTGCGAACAACGCAAGCGCACGGAGCCGCTTTGCTCGCAGCCGAAGAAGG			513
Sbjct 301	CGAAACAGCGTGCGAACAACGCAAGCGCACGGAGCCGCTTTGCTCGCAGCCGAAGAAGG			360
Query 514	CGGCCATAG	522		
Sbjct 361	CGGCCATAG	369		



## 附录九 缩略词表

缩写	英文	中文
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol	三羟甲基氨基甲烷
DTT	1,4-dithiothreitol	二硫苏糖醇
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid	乙二胺四乙酸钠
Acr	Acrylamide	丙烯酰胺
Bis	N,N'-Methylene bisacrylamide	N,N'-亚甲基双丙烯酰胺
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基磺酸钠
SDS-PAGE	SDS polyacrylamide	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳
TEMED	Tetramethyl Ethylene Diamine	四甲基乙二胺
<i>E. coli</i> Trans5 $\alpha$	<i>Escherichia coli</i> . Trans5 $\alpha$	大肠杆菌 Trans5 $\alpha$
LB	Luria-Bertani	液体培养基
PBS	Phosphate buffer solution	磷酸盐缓冲液
bp	Base pair	碱基对
kDa	Kilo Daltons	千道尔顿
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
PCR	DNA polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
mM	mmol/L	毫摩尔每升
rpm	Revolutions Per minute	转/分钟

## 致 谢

与苏州这座美丽古城的缘分始于七年前，那时懂懂的我在这温情如水的江南小城里滋润成长。三年前，我有幸进入苏州大学研究学习，苏大“养天地正气，法古今完人”的校训犹记耳畔，一木一景，一步一移，猩红的独墅湖枫叶，金黄的本部银杏，都是我记忆里最美好的风景。三年的研究生学习生涯，使我成长和收获了很多，严谨的科研态度，熟练的实验技能，和睦的同学相处，都是我从身边的良师益友那儿学习到的。

在这里，首先我要感谢我的恩师贡成良教授。感谢您对我毕业论文的悉心指导，从课题的设计、实验思路的拓展、科研瓶颈的帮助，您都细心地讲解与指点，使我受益匪浅，也让我对于科研的道路更有信心和耐心。每每看到贡老师为科研忙碌的身影，那份专注的坚持，那满腔的热爱，都是值得我学习与努力的地方。

同时我还要感谢薛仁宇老师，曹广力老师，胡小龙老师和冯永杰老师在平时的学习和生活中对我的悉心指导与殷切关怀。在一些实验进程中，薛老师会提出宝贵的建议和解决思路，对我毕业论文的修改与撰写都有很大的帮助。曹老师亲切豁达的生活态度，对于学生的倾囊相授，让我能够更加积极地面对科研生活。亦师亦友的胡老师，平易近人的冯老师都在我三年的学习生涯中给予了很多帮助，在这里向各位老师表达我由衷的谢意。

其次，感谢我三年的同窗小伙伴们：耿薇、张婷婷、蒋梦生，感谢你们三年的包容和帮助，怀念我们一起嬉笑，一起畅谈科研，一起做实验的快乐日子。感谢朱敏师姐、梁子师姐、张云山师兄对我实验的帮助和生活的照顾。还有师弟师妹们，感谢你们为我的研究生生活平添了很多欢乐。

最后我要感谢我的父母，感谢你们对我无私地付出，给我无微不至地关怀，无论经历多少风雨，你们永远给我最温暖的怀抱。还要感谢我的欧阳先生，谢谢你的爱护与陪伴。

谨向参与论文评阅和答辩的全体专家们致以最诚挚的谢意！

王章艳

2019年4月于苏州大学独墅湖