

研究报告

Research Report

麒麟鸡 miRNA-1623 与靶基因 Wnt4 的靶标验证分析

李珊珊^{1,2} 孙红梅² 张伟² 董振² 李春义^{2*} 杜炳旺^{1*}

1 广东海洋大学动物科学系, 湛江, 524088; 2 中国农业科学院特产研究所特种经济动物分子生物学国家重点实验室, 长春, 130000

* 通讯作者, lichunyi1959@163.com; dudu903@163.com

摘 要 麒麟鸡(frizzle chicken)是我国亚热带地区特有的一种具有卷羽特性的优质肉鸡品种。本课题组前期研究发现在麒麟鸡皮肤中高度表达 miRNA-1623 (miR-1623), 因此推测其参与麒麟鸡毛囊发育及卷羽的形成过程。为研究其独特的毛囊发育及卷羽散热机制, 本研究利用生物信息学手段根据其靶标结合位点寻找其潜在靶标 Wnt4 基因, 并利用 qRT-PCR 对卷羽麒麟鸡和片羽怀乡鸡中的 miR-1623 与 Wnt4 的表达水平进行了检测。进一步通过构建双荧光素酶报告基因 pmirGlo 载体在细胞水平对 miR-1623 与 Wnt4 的靶标关系进行了验证。结果表明: Wnt4 mRNA 的 3'UTR 存在 miR-1623 靶标结合位点(TGCCTG); 相对于怀乡鸡, 麒麟鸡皮肤中 miR-1623 表达水平显著升高($p<0.01$), Wnt4 mRNA 表达水平显著降低($p<0.01$); 双荧光素酶检测分析发现 miR-1623 靶向负调控 Wnt4-3'UTR。本实验可为进一步揭示 miRNA-1623 在禽类毛囊生长发育过程中的作用提供参考。

关键词 麒麟鸡, 卷羽, miRNA-1623, Wnt4, 双荧光素酶

Target Validation Analysis of Kirin Chicken miRNA-1623 and Its Target Gene Wnt4

Li Shanshan^{1,2} Sun Hongmei² Zhang Wei² Dong Zhen² Li Chunyi^{2*} Du Bingwang^{1*}

1 Department of Animal Science, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, 524088; 2 State Key Laboratory for Molecular Biology of Special Economic Animals, Institute of Special Animal and Plant Sciences of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun, 130000

* Corresponding authors, lichunyi1959@163.com; dudu903@163.com

DOI: 10.13417/j.gab.036.000000

Abstract Kirin chicken (frizzle chicken) is a high quality broiler breed with frizzled feather characteristics in sub-tropical zone of China. The previous study found that miRNA-1623 (miR-1623) was highly expressed in the skin of Kirin chicken, so we predicted that miR-1623 might participate in the hair follicle development and frizzle forming process of Kirin chicken. In order to study its unique hair follicle development and cooling mechanisms of frizzled feathers, we found potential target Wnt4 gene based on its binding site through bioinformatics analysis, and detected the expression level of miR-1623 and Wnt4 in Kirin chicken and Huaixiang chicken by using qRT-PCR. Furthermore, the target relationships between the miR-1623 and the Wnt4 were verified at the cell level by constructing a dual luciferase reporter gene pmirGlo vector. The results showed that a target gene binding site (AGGCAC) of the miR-1623 was detected in the 3'UTR of Wnt4 gene; Compared with Huaixiang chicken (no frizzled morphology), the expression level of miR-1623 in the skin of Kirin chicken was significantly increased ($p<0.01$) but Wnt4 mRNA was significantly decreased ($p<0.01$). Dual luciferase assay analysis revealed that miR-1623 negatively regulated Wnt4-3'UTR. This study could provide a reference for further revealing the role of

基金项目: 本项目由广东省创新强校重大项目(GDOU2013050222)资助

引用格式: Li S.S., Sun H.M., Zhang W., Dong Z., Li C.Y., and Du B.W., 2017, Target validation analysis of kirin chicken miRNA-1623 and its target gene wnt4, Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology), 36(3): 0000-0000 (李珊珊, 孙红梅, 张伟, 董振, 李春义, 杜炳旺, 2017, 麒麟鸡 miRNA-1623 与靶基因 Wnt4 的靶标验证分析, 基因组学与应用生物学, 36(3): 0000-0000)

miR-1623 in poultry follicle growth and development.

Keywords Kirin chicken, Frizzle, miRNA-1623, Wnt4, Dual luciferase

麒麟鸡(frizzle chicken)又称翻毛鸡、卷毛鸡,是主产于广东粤西地区的优质肉鸡品种。该鸡羽毛向上翻卷,部分羽毛较为稀疏,散热性能好,能够很好地适应亚热带海洋性季风气候特点(陈洁波等, 2013)。因此,有必要对麒麟鸡卷羽性状的形成让机制进行研究,以确保麒麟鸡优良基因稳定遗传。家禽羽型主要分为3种:片羽、丝羽和卷羽。大部分禽类的羽毛是普通的片羽,卷羽较为罕见。麒麟鸡的卷羽则是由于羽钩不能与相邻羽小枝的背缘相勾连,导致不能形成闭合羽片,所以呈现为独特的卷羽表型(李姗姗等, 2015)。

羽毛由毛囊发育而来,毛囊是胚胎期外胚层与间充质相互作用发育形成的具有合成多种特异角质蛋白功能的复杂的动态器官,其作用机制可作为我们研究卷羽的一个重要特征(马馨等, 2013)。

资料显示,毛囊的发育主要受 Wnt、BMP、Hedgehog、Notch 等信号通路的影响,其 Wnt 信号通路是参与毛囊形态发生发育及再生的最重要信号通路。在家禽胚胎发育时期,Wnt 信号通路对毛囊起始发育发挥尤其重要作用。研究表明,E11.5~E13.5 天,Wnt 受体蛋白 Wnt1、Wnt3a、Wnt4 和 Wnt6 可作为真皮层来源的信号的 Wnt 配体在背部上皮细胞中高表达(DasGupta and Fuchs, 1999; Wagner et al., 2000; Rodriguez-Niedenfuhr et al., 2003),这些配体可通过旁分泌激活真皮层上层表达的 Wnt 信号,从而调控了毛囊细胞的增殖(Chang et al., 2004)。E13.5~E14.5 天,Wnt10b 受体蛋白 Lef1 不依赖于 Wnt/ β -catenin 能维持上皮细胞未分化状态的调节子 TCF,均在此时期高表达(Zhou et al., 1995; Nguyen et al., 2006)。此时,Wnt/ β -catenin 入核 Lef1/TCF 家族蛋白结合,激活 β -catenin 信号和 Lef1/TCF 的 DNA 受体结合域构成了转录激活子,从而激活下游的 Wnt 经典信号的靶基因 (Willert et al., 1998; Korswagen and Clevers, 1999; Waltzer and Bienz, 1999)。E14.5 天,基板形成,其 Wnt10b、Wnt10a 和 Wnt7b 表达上调,而在基板表达的 Wnt 信号导致了其下的真皮层细胞形成真皮聚集(Reddy et al., 2001)。E15.5 天,基板形成时期,NF- κ B 信号对于 Wnt/ β -catenin 信号通路的维持和 Wnt10b 的表达是必要的,但对 β -catenin 特异性的转录激活却不是必要的(Andl et al., 2002)。在随后毛发向下生囊的时期,Wnt10b 和 Wnt10a 表达在内根鞘前体细胞中,而在真皮层毛乳 s 头中表达逐渐下调 (Reddy et

al., 2001)。综上所述,Wnt 信号通路在毛囊向毛干分化中起重要作用。因此,阐明 Wnt 信号通路在毛囊生长发育过程中的作用机制对探究卷羽的形成机理尤为重要。

MicroRNA (miRNA)是一种由 22 个碱基左右组成的内源性单链小分子 RNA,是目前基因表达的主要调控因子(Felekkis et al., 2010)。研究表明,在机体内,成熟的 miRNA 通过与靶 mRNA-3' UTR 内的靶序列互补配对,引起靶基因 mRNA 的稳定性降低或降解从而介导其蛋白质翻译过程的抑制,是真核生物在基因转录后和翻译水平上的重要调控方式(Reinhart et al., 2000; Bartel, 2004; Doench and Sharp, 2004; 韩璐和栾雨时, 2014)。miRNA 的研究已成为当今生物学领域研究的一个热点,利用 miRNA 的调控阐释畜禽重要经济性性状形成的分子机制是一个新的研究靶点。

本实验室前期分别对 E13 胚龄卷羽麒麟鸡和片羽怀乡鸡的背部皮肤进行了 miRNA 高通量测序和转录组测序,且对两种测序数据进行了精确分析,发现在 miRNA 高通量测序数据中 miR-1623 在麒麟鸡皮肤存在极显著高丰度表达($p < 0.01$),且在家禽中特异性表达。因此,本研究首先根据高通量测序数据获得 miR-1623 成熟核苷酸序列和所有转录组数据,使用生物信息学软件预测得出 miR-1623 潜在靶基因为 Wnt4,其次通过 qRT-PCR 检测两种鸡中 miR-1623 和 Wnt4 基因的表达量,推测 miR-1623 可能调控 Wnt4 基因的表达。最后通过构建野生型和突变型载体,使用双荧光素酶的方法在细胞水平上准确验证 miR-1623 与 Wnt4 基因的靶标关系。为以后研究 miR-1623 在毛囊生长发育过程的分子机制研究奠定基础。

1 结果与分析

1.1 miR-1623 靶基因预测

将获得的 miR-1623 成熟核苷酸序列 GCAGG-CACAGACAGGCAGA 及转录组测序全部序列共同输入 RNAhybrid 软件进行靶标计算,在满足此软件各种条件的情况下,选择评分较高的靶基因 Wnt4 作为 miR-1623 潜在靶基因,同时利用 Targetscan 软件种子序列配对原则,即 miR-623 的种子序列区 AGGCAC 与 Wnt4 基因 3'UTR 进行互补配对,最终

选定为 Wnt4 基因为 miR-1623 潜在靶基因, 并使用 Primer 5 软件成功找到在其 3'UTR 区的靶基因结合位点(图 1)。

1.2 qRT-PCR 检测 miR-1623 和 Wnt4 在麒麟鸡和怀乡鸡皮肤中的表达水平

以怀乡鸡皮肤作为阴性对照进行实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 扩增, 通过熔解曲线和扩增曲线可知, 内参基因(U6 和 β -actin)和目的基因(miR-1623 和 Wnt4)均被特异性扩增。导出 CT 值, 利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 分析方法进行数据分析发现, 与对照相比, 麒麟鸡中 miR-1623 表达量极显著上调($p < 0.01$) (图 2A); 与对照相比, 麒麟鸡中 Wnt4 表达量极显著下调($p < 0.01$) (图 2B)。结果表明 miR-1623 可能会抑制 Wnt4 基因表达。推测 miR-1623 负向调控 Wnt4 基因表达。

1.3 Wnt4-3'UTR 区克隆及 pmirGlo 野生型、突变型重组质粒构建与鉴定

以麒麟鸡皮肤 cDNA 为模板, 设计特异性引物进行 Wnt4-3'UTR 的 PCR 扩增。PCR 产物进行凝胶电泳分析, 可明显见到在 420 bp 左右出现目的条带(图 3, 泳道 1), 与预测条带相符, 表明成功克隆了 Wnt4-3'UTR。将构建成功的 pmirGlo-WT 野生型重组载体和突变型重组载体使用 *Nhe* I 和 *Sal* I 双酶切鉴定, 条带显示在 7 350 bp 左右和 420 bp 左右出现

目的条带(图 3, 泳道 2, 3), 与预期结果相符。将重组质粒送上海生工进行测序鉴定, 结果发现野生型在 842 处出现靶标结合位点 CGTTC (图 4A), 突变型在 842 处出现靶标结合位点 TGCCTG (图 4B), 将两者进行序列比对发现, 除靶标结合位点突变外, 剩余碱基均未突变(图 4C)。

1.4 双荧光素酶活性表达检测结果

由于 PmirGlo 载体不携带 GFP 荧光, 使用相似大小带有 GFP 载体进行转染发现, 48 小时检测转染效率较高, 此条件下即可进行荧光信号检测(图 5B)。PmirGlo 载体是以萤火虫荧光素酶的活性作为报告基因(M1), 海肾荧光素酶的活性作为内参对照基因(M2), 最后 M1/M2 的值为荧光素酶活性值。转染 WT+mimic 双荧光素酶信号比值明显下降($p < 0.05$), 表明其结果差异显著(图 5A)。然而, Mut+mimic、WT+Nc、Mut+Nc、NC 双荧光信号差异不显著($p > 0.05$)。该结果进一步验证 miR-1623 靶向调控 Wnt4-3'UTR, 且负向调控 Wnt4 基因的表达。

2 讨论

麒麟鸡的卷羽与常见的片羽有较大区别, 研究发现, 飞羽羽轴较粗壮, 且向外弯曲, 羽枝短小而稀疏, 导致羽小枝不闭合, 正羽羽轴弯曲。羽毛微观结构显示, 麒麟鸡卷羽羽钩不能与相邻的羽小枝的背缘相勾连, 形成不了闭合羽片(陶林等, 2015)。由此说明, 卷羽羽小枝及羽钩的生长情况与正常羽不同, 这值得我们对麒麟鸡卷羽的分子机制进行深入研究。Wnt 信号途径参与哺乳动物的胚胎发育、皮肤形成、毛发生长等形成机制, 是一种进化上保守的信号传

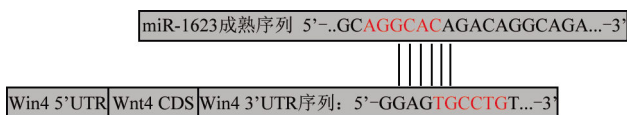


图 1 Wnt4-3'UTR 与 miR-1623 靶标结合位点

Figure 1 Target binding sites of Wnt4-3'UTR and miR-1623

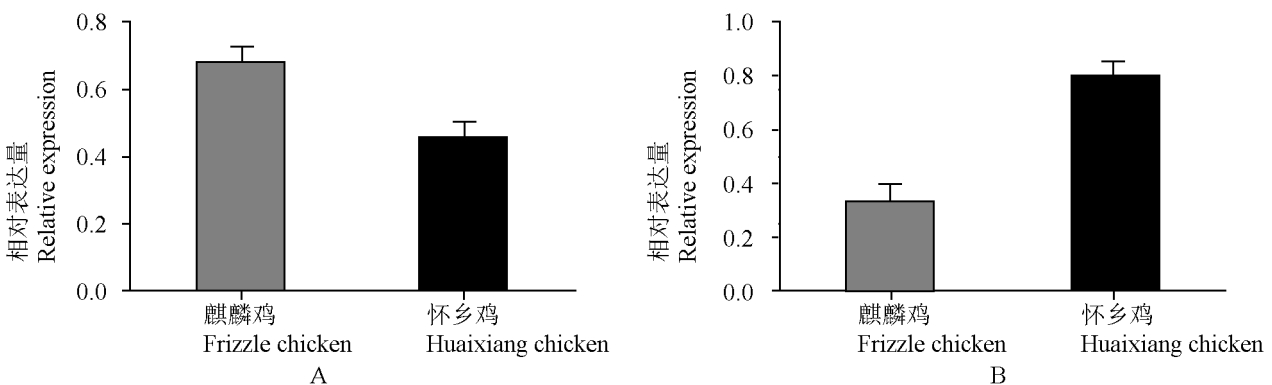


图 2 qRT-PCR 检测 miR-1623 与 Wnt4 靶标关系

注: A: miR-1623 表达量; B: Wnt4 表达量

Figure 2 Detection of the target relationship between miR-1623 and Wnt4 by using qRT-PCR

Note: A: miR-1623 expression quantity; B: Wnt4 expression quantity

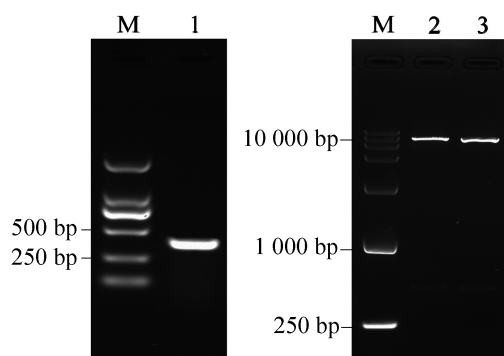


图3 Wnt4-3'UTR 克隆及 PmirGlo 重组载体双酶切鉴定

注: M: Marker; 1: Wnt4-3'UTR 目的片段; 2: WT 重组质粒双酶切片段; 3: Mut 重组质粒双酶切片段

Figure 3 Double enzyme digestion of Wnt4-3'UTR cloning and PmirGlo recombinant vector

Note: M: Marker; 1: Wnt4-3'UTR fragment; 2: WT recombinant plasmid double digested fragment; 3: Mut recombinant plasmid double digested fragment

导途径,在动物机体中均有很重要的作用。其中经典的 Wnt/ β catenin 信号通路参与了毛囊的生物学过程,具有调节真皮细胞的形态发生、调控毛囊的形成、发育增殖以及相关细胞的分化作用(Andl et al., 2002)。Andl (2002)等在用 K14 启动子异位过表达 Wnt 经典信号拮抗剂 Dkk1 的转基因小鼠中发现基板形成终止,毛发模式形成被阻断,揭示了 Wnt 经典信号通路在毛囊发育起始过程中起着重要作用。Chen 等(2012)认为 Wnt 信号通路中高浓度的 Wnt1、Wnt3a、Wnt4 和 Wnt6 存在于背部皮肤的上皮层导致激活了真皮层上层表达的 Wnt 信号,进而调控了成纤维细胞的增殖。Zhang 等(2009)认为在胚胎期 13 日龄,毛囊前基板的基因表达模式的建立还需要 NF- κ B 信号的修正,Wnt/ β -catenin 信号与 NF- κ B 信号交互作用承担建立毛囊表达模式的机制的责任。综上所述,胚胎时期毛囊的生长发育并不仅仅是 Wnt/ β -catenin 信号通路独立发挥作用的,而是通过与其他信号通路(如 NF- κ B 信号通路等)一起交互影响,介导了一系列上皮细胞和真皮细胞的相互作用,调控了基础细胞向毛干分化,对毛发模式形成过程产生着重要的影响。而 Wnt4 蛋白是 Wnt 信号通路中的一个蛋白,它对毛囊的调控作用属于 Wnt 信号通路中的一种类型,但是其影响毛囊形成和生长的具体机制尚不清楚,需进一步进行探究。

本实验室首次对麒麟卷羽鸡毛囊进行 miRNA 及其靶基因 Wnt4 的调控机制进行探究,首先利用靶基因预测软件对 miR-1623 和转录组数据进行靶标预测,筛选出 Wnt4 乃潜在靶基因,但是生物信息学

方法假阳性较高,通常一个 miRNA 可以预测出几百个甚至上千个靶基因,缩短筛选时间,减小工作量,因此使用荧光定量检测 miRNA 靶基因可以很快的进行初步筛选,缩短工作量,是一个很好的初步筛选工具。但只可作为辅助性工具,不可能作为实验依据,之后通过具体的实验验证方可具有应用性。其次使用 qRT-PCR 的方法,我们检测出麒麟鸡中 miR-1623 的表达量高于怀乡鸡,其靶基因 Wnt4 表达量低于怀乡鸡。miR-1623 和 Wnt4 基因在同一个体中呈现出此起彼伏的负相关关系,该结果表明 miR-1623 可能靶向 Wnt4 3'UTR 区结合位点。目前,双荧光素酶报告基因检测系统被认为是判定 miRNA 是否与靶基因 3'UTR 结合的主要方法。因此,本研究构建野生型重组质粒和突变型重组质粒转染细胞,在细胞水平进行验证,最后发现与其它对照组相比,WT+mimc 双荧光素酶信号显著降低($p < 0.05$),差异显著。据此我们推测 miR-1623 负调控 Wnt4 基因表达,从而可能影响了麒麟鸡的卷羽形成,但是其具体的调控机制需要我们进一步挖掘。

3 材料与方法

3.1 实验材料

13 胚龄麒麟鸡胚胎背部皮肤由湛江晋盛牧业科技有限公司提供;细胞株人胚肾细胞 293T 由本实验室保存;TRIZOL Reagent、PCR Taq premix、T4 DNA 连接酶(TaKaRa, 日本);EasyScript® One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix、TransScript® Green miRNA Two-Step qPCR SuperMix、感受态细胞 DH5 α 、双荧光素酶试剂盒(全式金, 北京);DMEM、OPTI-MEM、标准胎牛血清(Gibco, 美国);X-tremeGENE HP 转染试剂(Roche, 瑞士);胰酶(Life Tech, 美国);Nhe I 和 Sal I 内切酶(NEB, 美国);琼脂糖凝胶回收试剂盒(生工, 上海);荧光素报告基因载体双荧光报告质粒(PmirGlo)、大量质粒 DNA 提取试剂盒(Promega, 美国);Synergy H1 多功能酶标仪(BioTek, 美国);miR-1623mimic 和 Ncontrol 由广州锐博有限公司合成。

3.2 miR-1623 潜在靶基因预测

利用本实验室前期 miRNA 高通量测序和转录组测序数据进行分析,获得 miR-1623 成熟肽序列和所有 mRNA 序列,将其共同输入生物信息学软件 RNA-hybrid (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/submission.html>),根据此软件的计算法则,使得 miRNA 第 8 到第 12 个碱基必须与 mRNA 是完全互补配对方可作为候选靶基因;其次,我们又利用 Tar-

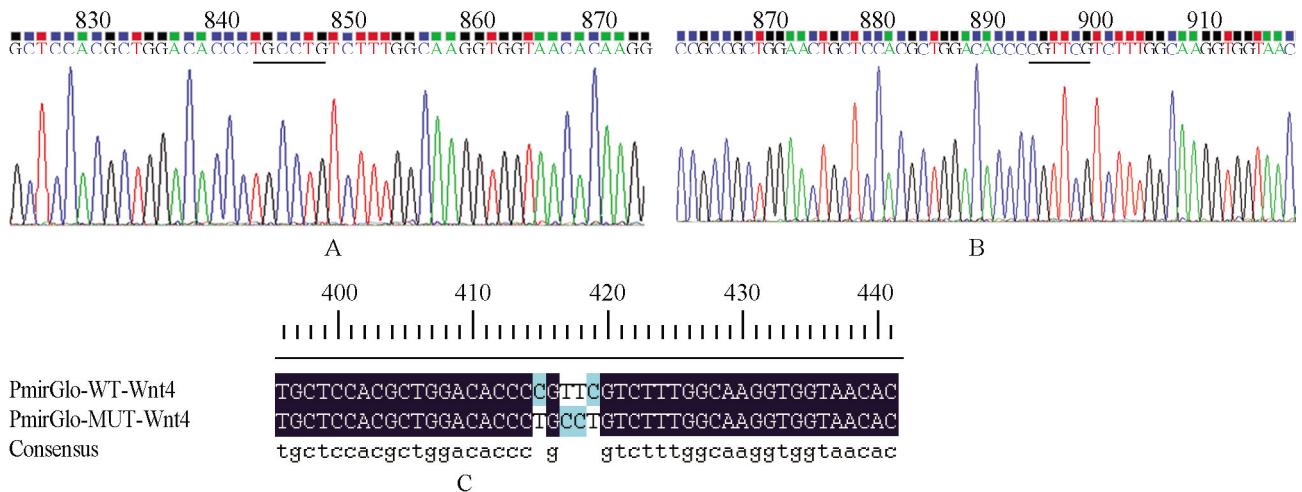


图4 重组质粒测序鉴定图

注: A: WT 测序图; B: Mut 测序图; C: WT 和 Mut 序列比对

Figure 4 Sequencing identification map of recombinant plasmid

Note: A: WT DNA sequencing; B: Mut DNA sequencing; C: Sequence alignments of WT and Mut

getscan 软件对候选靶基因进行进一步预测, 获得最终潜在靶基因。并利用此软件的种子序列配对原则找出 miR-1623 种子区与靶基因的靶标结合位点。且使用 Primer 5.0 软件找到靶基因覆盖 miR-1623 种子序列的结合位点以构建野生型载体和突变型载体。

3.3 总 RNA 提取和反转录

液氮研磨麒麟鸡背部皮肤, 利用 Trizol 法提取总 RNA, 利用酶标仪鉴定 RNA 纯度和浓度后, 进行反转录反应。

miR-RNAs 反转录: 总体系 20 μ L, Total RNA 2 μ g, TransScript[®] miRNA RT Enzyme Mix 1 μ L, 2 $\times$ TS mRNA Reaction Mix 10 μ L, RNase-free Water 补足至 20 μ L。按照反应体系 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 85 $^{\circ}$ C 5 s 失活 RT Enzyme Mix。

mRNA 反转录: 总体系 20 μ L, Total RNA/mRNA 5 μ g, Anchored Oligo (dT) 18Primer 1 μ L, 2 $\times$ ES Reaction Mix 10 μ L, EasyScript[®] RT/RI Enzyme Mix 1 μ L, gDNA Remover 1 μ L, RNase-free Water 补足至 20 μ L。按照程序 42 $^{\circ}$ C 下孵育反转录 15 min, 85 $^{\circ}$ C 加热 5 s 失活 EasyScript[®] RT/RI 与 gDNA Remover。

3.4 实时荧光定量 PCR

分别以 miRNAs 和 mRNA 反转录的 cDNA 为模板进行实时定量荧光 PCR, 分别以 miRNA-1623 和 Wnt4 为目的基因, 分别用 U6 和 β -actin 基因作为内参结果进行校正, 引物信息列于表中(表 1), 为消除实验误差, 每个处理进行 3 次重复实验。

反应体系: Template cDNA 2 μ L, Forward Primer (10 μ mol/L) 0.4 μ L, Reverse Primer (10 μ mol/L) 0.4 μ L, 2 $\times$ TransStart[®] TOP/Tip Green qPCR SuperMix 10 μ L, PassiveReferenceDye (50 $\times$) 0.4 μ L, ddH₂O 补足至 20 μ L。

反应条件: 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 94 $^{\circ}$ C, 5 s; 60 $^{\circ}$ C, 30 s; 45 个循环。添加熔解曲线程序: 95 $^{\circ}$ C, 15 s; 60 $^{\circ}$ C, 1 min; 95 $^{\circ}$ C, 15 s; 60 $^{\circ}$ C, 15 s。

3.5 Wnt4 基因的 3'-UTR 野生型及突变型重组载体构建

以 cDNA 为模板, 利用引物 Wnt4-WT-F/R (野生型)进行 PCR 反应, PCR 产物经 1%凝胶电泳鉴定胶回收后连接至 pMD19-Tvector, 转化 DH5 α 感受态细胞, 挑取菌落摇菌, 提取质粒送上海生工测序鉴定, 鉴定成功后将载体命名为 pMD-Wnt4。

使用 *Nhe* I 和 *Sal* I 限制性内切酶对 PmirGlo 载体和 pMD-Wnt4 进行双酶切。胶回收目的片段利用 T4 连接酶进行连接反应, 随后将连接产物转化到 DH5 α 感受态细胞后, 挑选单克隆菌进行摇菌, 小提质粒进行酶切和测序鉴定。将鉴定成功的载体命名为 PmirGlo-WT-Wnt4 (WT)。

随后, 根据靶基因预测软件获得 miR-1623 及其靶基因 Wnt4 的 3'UTR 靶标结合位点, 结合位点由 GTGCC 突变为 TGCCT, 该实验操作由武汉金凯瑞公司协助进行, 且将其命名为 PmirGlo-Mut-Wnt4 (Mut)。

3.6 双荧光素酶报告系统检测 miR-1623 与 Wnt4 的靶标效率

提前接种 293T 细胞于 6 孔板中, 待其融合度达

表 1 引物信息

Table 1 Primer informations

引物名称	序列(5'-3')	碱基长度(bp)
Primer name	Sequence (5'-3')	Bases in length (bp)
miR-1623	ACCGCAGGCACAGACAGGCAGT	22
miR-U6	TGCTTTGGCAGCACATATACCAA	23
Reverse Primer	GATCGCCCTTCTACGTCGTAT	21
WNT4-F	TCTACGCCATCTCTTCAGCA	20
WNT4-R	AGGCAATGTTATCGGAGCAG	20
β -actin-F	TGCCAGGGTACATTGTGGTA	20
β -actin-R	TGCGTGACATCAAGGAGAAG	20
Wnt4-WT-F	CTAGCTAGCTGAGGAGGAGACCTGCGAGAA	30
Wnt4-WT-R	CGCGTCGACATCGGAGCAGCCAGACCAC	28

注: Reverse primer: miRNA 通用下游引物; 黑体加粗是保护碱基; 斜体是酶切位点: *Nhe* I (GCTAGC), *Sal* I 酶(GTCGAC)

Note: Reverse Primer: The miRNA universal downstream primer; Boldface is protection base; Italic is restriction sites: *Nhe* I (GCTAGC), *Sal* I (GTCGAC)

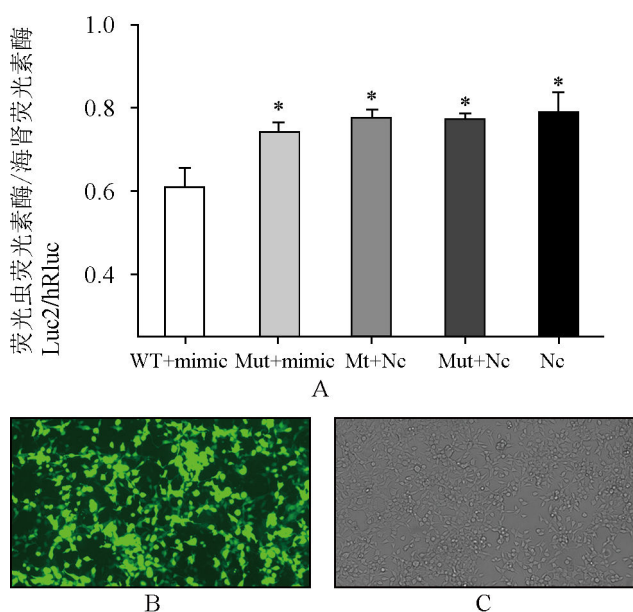


图 5 双荧光素酶报告分析

注: A: WT+mimic: PmirGlo-Wnt4-WT+miR-1623mimic; Mut+mimic: PmirGlo-Mut-Wnt4+miR-1623mimic; WT+Nc: PmirGlo-WT-Wnt4+miR-1623 Ncontrol; Mut+Nc: PmirGlo-Mut-Wnt4+miR-1623 Ncontrol; NC: 阴性对照; *: 与 WT-mimic 相比差异显著 ($p<0.05$); B: 转染 293T 细胞 48 h 后, 倒置荧光显微镜下荧光表达情况; C: 倒置正常显微镜下细胞形态

Figure 5 Dual luciferase report analysis

Note: A: WT+mimic: PmirGlo-Wnt4-WT+miR-1623mimic; Mut+mimic: PmirGlo-Mut-Wnt4+miR-1623mimic; WT+Nc: PmirGlo-WT-Wnt4+miR-1623 Ncontrol; Mut+Nc: PmirGlo-Mut-Wnt4+miR-1623 Ncontrol; NC: Negative control; *: Significant difference when compared with the WT-mimic ($p<0.05$); B: Transfected 293T cells after 48 h, the fluorescence expression under inverted fluorescence microscope; C: Cell morphology under inverted normal microscope

80%左右时, 开始进行转染操作, 添加 1 μ g 质粒 (PmirClo 和 mimic) 和 3 μ L 转染试剂于 200 μ L opti-MEM 培养基中, 室温孵育 25 min 后, 小心将其添加至 293T 细胞中, 12 h 后更换完全培养基, 由于该载体不携带 GFP 报告基因无法判断转染效率, 本实验利用大小相似载体并携带 GFP 标记蛋白的 plvTHM 载体进行转染效率评价。转染后 48 h 按照双荧光素酶试剂盒说明书(全式金)进行荧光检测, 利用 Synergy H1 多功能酶标仪检测发光信号, 将加入 Luciferase Reaction Reagent 检测萤火虫荧光素酶报告基因的活性记作 M1, 加入 Luciferase Reaction Reagent II 检测海肾荧光信号记作 M2, PmirGlo 载体是以萤火虫荧光素酶的活性为报告基因, 所以, M1/M2 的值为最终检测值。本实验为消除实验误差, 每组进行 3 个重复。实验一共分为 5 组, 第一组 PmirGlo-Wnt4-WT+miR-1623mimic (WT+mimic); 第二组 PmirGlo-WT-Wnt4+miR-1623 Ncontrol (WT+Nc), 第三组 PmirGlo-Mut-Wnt4+miR-1623mimic (Mut+mimic); 第四组 PmirGlo-Mut-Wnt4+miR-1623 Ncontrol (Mut+Nc), 第五组 NC (相同处理不添加质粒和 mimic)。

3.7 数据统计与分析

利用 Excel 软件进行数据统计和分析, 利用 GraphPad prism 5 绘图软件进行图形绘制, 数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 以 t 检验判断差异显著性。

作者贡献

李珊珊和孙红梅是本研究的实验设计和实验研究执行人, 完成数据分析与初稿写作; 张伟参与实验

结果分析;董振负责论文修改;李春义和杜炳旺是项目的构思者和负责人。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本项目由广东省创新强校重大项目(GDOU2013-050222)资助。感谢河南农业大学博士李东华提供实验思路的参考意见。

参考文献

- Andl T., Reddy S.T., Gaddapara T., and Millar S.E., 2002, WNT signals are required for the initiation of hair follicle development, *Dev. Cell*, 2(5): 643-653
- Bartel D.P., 2004, microRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell*, 116(2): 281-297
- Chang C.H., Jiang T.X., Lin C.M., Burrus L.W., Chuong C.M., and Widelitz R., 2004, Distinct Wnt members regulate the hierarchical morphogenesis of skin regions (spinal tract) and individual feathers, *Mech. Dev.*, 121(2): 157-171
- Chen D., Jarrell A., Guo C., Lang R., and Atit R., 2012, Dermal β -catenin activity in response to epidermal Wnt ligands is required for fibroblast proliferation and hair follicle initiation, *Development*, 139(8): 1522-1533
- Chen J.B., Tao L., Du B.W., Wang Z.Y., Yang F.X., and Li N.B., 2013, The feather characteristics and growth performance of frizzle chicken, *Anhui Nongye Kexue (Journal of Anhui Agri. Sci.)*, 41(17): 7561-7563 (陈洁波, 陶林, 杜炳旺, 汪忠艳, 杨芬霞, 李乃宾, 2013, 麒麟鸡(翻毛鸡)外貌性状和生长性能研究, *安徽农业科学*, 2013, 41(17): 7561-7563)
- DasGupta R., and Fuchs E., 1999, Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation, *Development*, 126(20): 4557-4568
- Doench J.G., and Sharp P.A., 2004, Specificity of microRNA target selection in translational repression, *Genes Dev.*, 18(5): 504-511
- Felekis K., Touvana E., Stefanou C., and Deltas C., 2010, microRNAs: a newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease, *Hippokratia*, 14(4): 236-240
- Han L., and Luan Y.S., 2014, Progress on the Research of Plant miR168, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 33(2): 438-444 (韩璐, 栾雨时, 2014, 植物 miR168 的研究进展, *基因组学与应用生物学*, 33(2): 438-444)
- Korswagen H.C., and Clevers H., 1999, Activation and repression of wingless/Wnt target genes by the TCF/LEF-1 family of transcription factors, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 64: 141-147
- Li S.S., Li D.H., Tao L., Dong J., Li Y.Q., Lan X.J., Ye W.Q., and Du B.W., 2015, Study on follicle development and characteristics of frizzled feather in kirin chicken. *Zhongguo Jiaqin (China Poultry)*, 37(16):15-18 (李姗姗, 李东华, 陶林, 董晶, 李艳青, 蓝贤进, 叶伟庆, 杜炳旺, 2015, 麒麟鸡卷羽毛囊发育规律及卷羽特点研究, *中国家禽*, 37(16): 15-18)
- Ma X., Chen Y., and Jiang H.Z., Structural characteristics of hair follicles and its regulation mechanism in mammals, *Zhongguo Caoshi Dongwu Kexue (Chinese Journal of Animal Science)*, 33(1): 53-56 (马馨, 陈洋, 姜怀志, 2013, 哺乳动物毛囊结构特征及调控机制, *中国草食动物科学*, 33(1): 53-56)
- Nguyen H., Rendl M., and Fuchs E., 2006, Tcf3 governs stem cell features and represses cell fate determination in skin, *Cell*, 127(1): 171-183
- Reddy S., Andl T., Bagasra A., Lu M.M., Epstein D.J., Morrissey E.E., and Millar S.E., 2001, Characterization of Wnt gene expression in developing and postnatal hair follicles and identification of Wnt5a as a target of Sonic hedgehog in hair follicle morphogenesis, *Mech. Dev.*, 107(1-2): 69-82
- Reinhart B.J., Slack F.J., Basson M., Pasquinelli A.E., Bettinger J.C., Rougvie A.E., Horvitz H.B., and Ruvkun G., 2000, The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, 403(6772): 901-906
- Rodriguez-Niedenfuhr M., Prols F., and Christ B., 2003, Temporal and spatial protease nexin 1 expression during chick development, *Gene Expr. Patterns*, 3(5): 611-614
- Tao L., Du B.W., and Zhang L., 2015, The development of frizzled Follicle and genetic characteristics of candidate gene KRT75 in frizzled feather chicken, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 48(4): 821-830 (陶林, 杜炳旺, 张丽, 2015, 卷羽鸡毛囊发育规律及卷羽候选基因 KRT75 遗传特征分析, *中国农业科学*, 48(4): 821-830)
- Wagner J., Schmidt C., Nikowits W J., and Christ B., 2000, Compartmentalization of the somite and myogenesis in chick embryos are influenced by wnt expression, *Dev. Biol.*, 228(1): 86-94
- Waltzer L., and Bienz M., 1999, The control of β -catenin and TCF during embryonic development and cancer, *Cancer Metastasis Rev.*, 18(2): 231-246
- Willert K., and Nusse R., 1998, Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 8(1): 95-102
- Zhang Y., Tomann P., Andl T., Gallant N.M., Huelsken J., Jerchow B., Birchmeier W., Paus R., Piccolo S., Mikkola M.L., Morrissey E.E., Overbeek P.A., Scheidereit C., Millar S.E., and Schmidt-Ullrich R., 2009, Reciprocal requirements for EDA/EDAR/NF-kappaB and Wnt/beta-catenin signaling pathways in hair follicle induction, *Dev. Cell*, 17(1): 49-61
- Zhou P., Byrne C., Jacobs J., and Fuchs E., 1995, Lymphoid enhancer factor 1 directs hair follicle patterning and epithelial cell fate, *Genes and Development*, 9(6): 700-713