

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.01026

鸡 6 个功能基因 microRNA 靶标区域 SNP 的生物信息学预测

耿立英¹, 张传生^{2,3}, 杜立新³

1. 河北科技师范学院生命科学系, 昌黎 066600;
2. 河北科技师范学院动物科学系, 昌黎 066600;
3. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所国家畜禽分子遗传育种中心, 北京 100193

摘要: *GDF-8*、*IGF-I*、*IGF-III*、*IGF2R*、*IGFBP2* 和 *GHR* 是鸡的重要经济性状候选基因。利用 miRanda 和 Targetscan 软件预测 6 个基因 3'UTR 潜在的 microRNA 靶标, 并发掘靶标区域 SNP 位点。结果表明: 在 6 个基因的 26 个 microRNA 靶标区域, 共检测到 125 个 SNP 位点, 在靶标及其 5'和 3'邻接等长侧翼区分别检测到 47 个、44 个和 35 个 SNPs 位点, 其中 12 个 SNP 定位于靶标种子序列互补区。种子序列互补区及其 3'侧翼区的 SNP 位点可能会影响 microRNA 的调控, 导致家禽的表型变异。

关键词: 鸡; 非翻译区; 小 RNA; 生物信息学; 单核苷酸多态性

Identification of SNPs located in putative microRNA target region of six functional genes in chickens through bioinformatic analysis

GENG Li-Ying¹, ZHANG Chuan-Sheng^{2,3}, DU Li-Xin³

1. Department of Life Science, Hebei Normal University of Science & Technology, Changli 066600, China;
2. Department of Animal Science, Hebei Normal University of Science & Technology, Changli 066600, China;
3. National Center for Molecular and Breeding of Animal, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Abstract: *GDF-8*, *IGF-I*, *IGF-III*, *IGF2R*, *IGFBP2*, and *GHR* are candidate genes affecting important economic trait in chicken. The putative microRNA target sites of 3' untranslated region of these genes were identified by means of specialized algorithms (miRanda and TargetScan), and the candidate SNPs located in the microRNA target region were also identified. Approximately 125 candidate SNPs were found throughout the 26 putative microRNA target regions in six gene 3'-UTR. Among the 125 SNPs, 47 were located in the microRNA targets, 44 and 35 were located in 5' and 3' flanking regions which equalled to the size of the given target. Twelve of the 47 candidates were located in the match of the microRNA seed. These SNPs, which were located in the match of the microRNA seed and 3' flanking regions may affect microRNA regulation and contribute to poultry phenotypic variation.

收稿日期: 2007-12-15; 修回日期: 2008-05-29

基金项目: 河北科技师范学院博士启动基金项目(编号:2006D005)和河北省自然科学基金项目(编号:C2008001308)资助[Supported by Scientific Research Foundation for the Doctor of Hebei Normal University of Science & Technology(No. 2006D005) and the Natural Science Foundation of Hebei Province (No. C2008001308)]

作者简介: 耿立英(1974-), 山东德州人, 硕士, 讲师, 研究方向: 动物功能基因组学。E-mail: rosegengly@126.com

通讯作者: 张传生(1976-), 山东泰安人, 博士, 副教授, 研究方向: 动物生物技术。E-mail: cszhang1976@126.com

Keywords: chicken; UTR; microRNA; bioinformatics; single nucleotide polymorphism

单核苷酸多态(Single nucleotide polymorphism, SNP)的多样性与经济性状的关联分析一直是畜禽遗传学研究的热点^[1]。目前,在禽类中已鉴定出了多个与生长、产蛋以及肉质等性状紧密连锁的SNP标记^[2~12]。这些SNP根据其是否定位于基因编码区,可分为编码区SNP和非编码区SNP两类,前者可改变蛋白序列导致生物性状改变,而后者作用的分子机制有待深入研究。

MicroRNA是一种内源性的非编码单链小分子RNA,可通过与mRNA 3'非翻译区(Untranslated regions, UTR)的结合,抑制蛋白合成,在翻译水平调节基因的表达^[13]。研究发现,3'UTR的SNP可通过3种途径对microRNA的调控产生影响:一是产生新靶标获得microRNA的调控,使蛋白表达水平降低^[14,15];二是破坏靶标失去microRNA的调控,使蛋白表达水平升高^[16];三是阻止microRNA与靶标结合,使microRNA的抑制功能丧失,导致蛋白表达水平升高^[17]。这些蛋白表达水平的变化可引起生物的表现型变异。上述调控机制对于禽类3'UTR区域SNP的功能研究具有重要意义。

鸡是一种重要的经济动物和模式生物。目前已鉴定的鸡microRNA近150种,这些miRNA的功能主要是调节与鸡胚生长、发育等过程有关的基因的表达。研究人员推测鸡中三分之一的基因都受到miRNA的调控^[18~21]。Lancman等^[21]证实*lin-4*、*let-7*等可调控*lin-41*的表达在鸡胚胎芽的发育中发挥作用。鸡*GDF-8*、*IGF-I*、*IGF-III*、*IGF2R*、*IGFBP2*和*GHR*作为经济性状的候选基因已被广泛研究^[2~12],这些基因是否存在类似调控机制尚无报道。鸡基因组测序的完成为禽类非编码区功能位点的生物信息预测分析提供了一个很好的切入点。

因此,本文以*Lin-41*为对照,运用生物信息技术对*GDF-8*等基因的3'UTR区进行分析,搜寻潜在的microRNA靶标及其SNP位点,不但可为上述基因的研究提供参考信息,而且还可为进一步对鸡全基因组范围的预测分析奠定基础。

1 材料和方法

1.1 网站和工具软件

由鸡基因组变异数据库(<http://chicken.genomics.org.cn/index.jsp>)、欧洲生物信息协会(ENSEMBL, 网

址 <http://www.ensembl.org/>)和美国国家生物技术信息中心(NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载鸡的基因组数据信息。分别由 <http://microrna.sanger.ac.uk/targets/v4/>、<http://www.targetscan.org/>网站下载鸡 microRNA 数据库(N=149)和鸡 microRNA“Seed”数据库。利用 DNAMAN(6.0)软件、MEGA(4.0)软件和 NCBI/Blast 软件进行序列分析、同源性比对;利用 miRanda_Windows_v1.0b 软件和 <http://microrna.sanger.ac.uk/targets/v4/>、<http://www.targetscan.org/>网站在线服务器对基因3'UTR区 microRNA 靶标进行预测。

1.2 序列搜集整理

从GenBank数据库中下载*GDF-8*(AF346599)、*IGF-I*(NM_001004384.1)、*IGF-III*(XM_421026)、*IGF2R*(NM_204970.1)、*IGFBP2*(NM_205359)、*GHR*(NM_001001131)和*Lin-41*(DQ117917)3'UTR基因序列,应用NCBI/Blast程序将其与鸡EST数据库和鸡基因组数据库相对比,获得本文用于比对分析的序列(表1)。

1.3 MicroRNA 靶标的预测

利用 miRanda(1.0)软件,装载鸡 microRNA 序列数据库与3'UTR序列,在默认参数条件下,预测 microRNA 靶标,以与“种子”序列严格碱基互补配对的位点作为候选 microRNA 靶标,进一步与 Targetscan 在线软件预测结果比对,分析候选 microRNA 靶标在不同物种中的保守性。

1.4 MicroRNA 靶标 SNP 的搜索

采用两种方法搜索 SNP: (1) 查询 <http://www.ensembl.org/>、<http://chicken.genomics.org.cn/>已报道的基因 SNP 位点;应用 NCBI/Blast 程序将基因3'UTR序列与鸡 SNP 数据库进行比对,同时利用 SNP 两侧序列(至少30 bp)进行基因组定位;上述方法检索到的 SNP 位点为已验证 SNP。(2) 参考文献[22]方法依赖于基因组测序重叠区域与 EST 数据库冗余序列比对发现的 SNP 位点,为待验证 SNP。具体方法:利用 DNAMAN(6.0)软件比对同源序列,并进行手动校正。

表 1 基因与其 3'UTR 大小
Table 1 Genes and their sizes of 3'UTR

基因名称 Gene	UTR 大小 Length of UTR (bp)	GenBank 登录号 GenBank accession number
<i>GDF-8</i>	1 186	AF346599、BU331995.1、BU207020.1、BU281944.1、NW_001471728.1 snp.35.12.57828.D.1、rs14597121snp.35.12.57910.I.1、rs13738332、rs13738333、 rs13738334、rs13738337、rs14597122、rs13738335、rs13738336、snp.35.12.58058.S.1、 rs13738338、rs13738339、snp.35.12.58061.S.1、snp.35.12.58092.I.2、rs15823859、 snp.35.12.58098.S.1、snp.35.12.58026.S.1、snp.35.12.58031.S.1、snp.35.12.57931.S.1、 snp.35.12.57932.S.1、snp.35.12.57937.S.1、snp.35.12.57941.S.1
<i>IGF-I</i>	98	NM_001004384.1、NW_0014715、gnlnti22704、gnlnti25744gnlnti28147、gnlnti28164、 gnlnti28890、AADN020063、BU454475.1、CT485883.1
<i>IGF-II</i>	618	XM_421026、AADN02030383.1、NW_001471698.1、AM064994.1、BU244503.1、 BU436879.1、BU121649.1、BU290172.1、BU288066.1、ti 261839791、ti 287828189、 ti 289713937、ti 224946701、ti 141277606、ti 293316791、ti 227186130
<i>IGF2R</i>	1 320	NM_204970.1、NW_001471668.1、BU326410.1、BU314657.1、BU215805.1、BU424027.1、 BU427952.1、BU477982.1、BU454352.1、BM440134.1、BU474673.1、BU246144.1、 BU463745.1、RS16264958、BU467821.1、BU296639.1、BU461826.1、BU413097.1、 BU241209.1、RS16264959、BU262739.1、
<i>IGFBP2</i>	2 136	NM_205359、NW_001471733.1、AADN02016811.1、BU249659.1、BU265616.1、 BU273389.1、BU219057.1、CN224426.1、BU362924.1、BU401541.1、BI391593.1、 BU376267.1、BU274028.1、BU379304.1、BU134073.1、BU279869.1、BU342328.1、 BU414549.1、BU458116.1、BX540363.3、BX540427.3、CO762730.1、
<i>GHR</i>	338	NM_001001131、NW_001471443.1、BU144131.1、BU201091.1、CN236928.1、BU451599.1
<i>Lin-41</i>	2 679	DQ117917

1.5 MicroRNA 靶标 SNP 的统计分析

统计 microRNA 靶标 5 邻接等长侧翼区、靶标区、3 邻接等长侧翼区以及靶标种子序列互补区的 SNP 位点数。按照参考文献[23]的方法，比较靶标种子序列互补区、靶标和 3'UTR 序列 SNP 位点数差异(以靶标及其 5 和 3 等长侧翼区代表整个 3'UTR)，Fisher's 精确性检验，每个靶标种子序列互补区长度为 7 bp。

1.6 候选 MicroRNA 与靶基因的共表达分析

根据文献[24~26]研究报道，结合 <http://www.chick.manchester.ac.uk/>网站提供的鸡胚 microRNA 表达信息，分析部分候选 microRNA 及靶基因的共表达信息。

2 结果与分析

2.1 3'UTR 区 microRNA 靶标的预测

由表 2 可见，应用miRanda(1.0)和Targetscan软件预测，共发现 51 个候选microRNA靶标。其中 *Lin-41* 靶标最多为 25 个，而*GHR*没有发现候选 microRNA靶标。*Lin-41* 预测结果包括已经证实的

gga-miR-125b、*gga-miR-15b* 和*gga-let-7* 等靶标。在*GDF-8* 等 6 个基因中共发现 26 个靶标，其中*GDF-8* 的*gga-miR-27(68~90)*、*gga-miR-29* 与*IGF2R* 的*gga-miR-211*、*gga-miR-204*在人、大鼠、小鼠和狗同源基因是保守的靶标。上述microRNA的“Seed”序列与 3'UTR靶序列均严格的碱基互补配对。

2.2 MicroRNA 靶标的候选 SNP 的发掘

IGFBP2 的 *gga-miR-16*、*gga-miR-15a* 与 *gga-miR-15b* 的靶标区缺乏相应的同源序列，无法发掘 SNP 位点。

由表 3 可见，在 23 个候选 microRNA 靶标中有 18 个靶标发现变异位点，其中在 9 个靶标的种子序列互补区搜索到变异位点。*IGFBP2* 的 *gga-miR-130a* 靶标是由碱基 T 缺失突变造成种子序列连续碱基互补配对，形成新的候选 microRNA 靶标。

2.3 MicroRNA 靶标 SNP 的统计分析

因 *IGF-I* 的 *gga-miR-181* 靶标的 5 侧翼序列少于 25 bp(靶标长度)，没有统计分析 5 侧翼区 SNP。

由表 4 可见，共搜寻到 125 个候选 SNP 位点，

表 2 基因 3'UTR microRNA 预测及其位置

Table 2 Locations of predicted target sites of individual miRNAs in the 3 UTRs

基因名称 Gene	MicroRNA 靶标位置 Position of miRNA-binding sites	个数 Number
<i>GDF-8</i>	<i>gga-miR-27b</i> (68-90; 259-279)、 <i>gga-miR-144</i> (104-129)、 <i>gga-miR-126</i> (678-696)、 <i>gga-miR-128</i> (256-278)、 <i>gga-miR-200a</i> (562-584)、 <i>gga-miR-29a</i> (614-634)、 <i>gga-miR-29b</i> (611-634)、 <i>gga-miR-29c</i> (615-634)、 <i>gga-miR-301</i> (840-867)	10
<i>IGF1</i>	<i>gga-miR-181b</i> (10-34)、 <i>gga-miR-183</i> (14-39)	2
<i>IGF-III</i>	<i>gga-miR-184</i> (60-78)	1
<i>IGFBP2</i>	<i>gga-miR-16</i> (67-94)、 <i>gga-miR-15a</i> (73- 94)、 <i>gga-miR-15b</i> (130-150)、 <i>gga-miR-130b</i> (1983-2006)、 <i>gga-miR-301</i> (1985-2006)、 <i>gga-miR-130a</i> (1981-2006)、 <i>gga-miR-34b</i> (1361-1388)	7
<i>IGF2R</i>	<i>gga-miR-30d</i> (151-171)、 <i>gga-miR-30e</i> (150-171)、 <i>gga-miR-30a-3p</i> (600-622)、 <i>gga-miR-142-5p</i> (1064-1086)、 <i>gga-miR-211</i> (117-139)、 <i>gga-miR-204</i> (117-139)	6
<i>Lin-41</i>	<i>gga-let-7i</i> (149-171; 231-247)、 <i>gga-let-7a</i> (149-171)、 <i>gga-let-7b</i> (64-92; 149-171)、 <i>gga-let-7c</i> (149-171)、 <i>gga-let-7g</i> (150-171)、 <i>gga-let-7d</i> (2110-2132)、 <i>gga-let-7f</i> (149-171)、 <i>gga-let-7j</i> (149-171)、 <i>gga-let-7k</i> (148-171; 225-247)、 <i>gga-miR-125b</i> (14-36)、 <i>gga-miR-221</i> (762-785)、 <i>gga-miR-153</i> (269-291)、 <i>gga-miR-218</i> (504-533)、 <i>gga-miR-203</i> (544-567)、 <i>gga-miR-222</i> (1236-1261)、 <i>gga-miR-34b</i> (2109-2130)、 <i>gga-miR-34c</i> (2109-2130)、 <i>gga-miR-9</i> (1379-1398; 2434-2461)、 <i>gga-miR-15b</i> (1912-1933)	25

表 3 MicroRNA 靶标序列变异

Table 3 Variation of microRNA target sequences

基因名称 Gene	小 RNA MicroRNA	MicroRNA 靶标 SNP MicroRNA target site SNP
<i>GDF-8</i>	<i>gga-miR-126</i> <i>gga-miR-128</i> <i>gga-miR-27b</i> (68-90) <i>gga-miR-27b</i> (259-279) <i>gga-miR-200a</i> <i>gga-miR-144</i> <i>gga-miR-29a</i> <i>gga-miR-29b</i> <i>gga-miR-29c</i> <i>gga-miR-301</i>	AA(A/C)GAATTTAGAGTA(A/C)TAATG (A/G)AATGGGTTTCTTACACTGTGA TCATCCATCTTTGAA <u>ACTGTGAA</u> (A/G)AATGGGTTTCTTAC <u>ACTGTGA</u> GT(A/G)TAGTGTA(A/-)TTTAGC(A/-)GTGTT(T/-) GCATTGCCAACATCCATAT <u>ACTGTAC</u> AATCAATGGCAATGGTGCT(A/C) AGTAATCAATGGCAATGGTGCT(A/C) ATCAATGGCAATGGTGCT(A/C) CTGCCTTTGCAACGTTACCGTT(T/-)TGCACTA
<i>IGF-III</i>	<i>gga-miR-184</i>	CCC(C/-)TGAGCCCCCTCC(G/C)(T/A)CCC
<i>IGF-1</i>	<i>gga-miR-181</i> <i>gga-miR-183</i>	T(C/T)CACAAGAATGAAGAATGAATGTG CAAGAATGAAGAATGAATGTGCCAT C
<i>IGF2R</i>	<i>gga-miR-30d</i> <i>gga-miR-30a-3p</i> <i>gga-miR-30e</i> <i>gga-miR-211</i> <i>gga-miR-204</i> <i>gga-miR-142-5p</i>	ATGTCATGGTTGT(T/-)GTTTACA GTTC(-/C)AAAGGT(A/T)(T/A)TGACTGAAAG AGATGTCATGGTTGT(T/-)GTTTACA ACAAGAAACCATTGAAAAGGGAA ACAAGAAACCATTGAAAAGGGAA CC(-/C)AGGTG(T/C)(T/C)(C/-)T(T/?)(T/A)A(A/-)TTTATGGG
<i>IGFBP2</i>	<i>gga-miR-130b</i> <i>gga-miR-301</i> <i>gga-miR-34b</i> <i>gga-miR-16</i> <i>gga-miR-15 a</i> <i>gga-miR-15 b</i> <i>gga-miR-130a</i>	T(-/T)GAGAT(G/C)(T/G)TT(T/-)GC(A/C)CTG GCGCT(C/T)T(-/T)GAGAT(G/C)(T/G)TT(T/-)GC(A/C)CTG CGAGAC(C/-)AAAGACTGTAAAT <u>ACTGCCTC</u> CGGGCCGCTTGCCCGCGGT <u>TGCTGCTG</u> GCTTGCCCGCGGT <u>TGCTGCTG</u> CGCTTGCCCGCGGT <u>TGCTGCTG</u> (A/C)GGCGCT(C/T)T(-/T)GAGAT(G/C)(T/G)TT(T/-)GC(A/C)CTG

注: 括号内显示的为靶标变异位点, 下划线注明的为 microRNA 靶标种子区互补序列。

Note: The polymorphic sites are shown in brackets and the match of microRNA seed are underlined in the microRNA target site SNP column.

表 4 MicroRNA 靶标及其侧翼区 SNPs 数
Table 4 Number of SNPs of the microRNA target sequences and flanking regions

基因名称 Gene	小 RNA MicroRNA	靶标长度 Length of target (bp)	SNP 数 Number of SNP			
			5 侧翼区 5 flanking regions	靶标区 MicroRNA target sites	3 侧翼区 3 flanking regions	种子序列互补区 Match of the microRNA seed
GDF-8	<i>gga-miR-126</i>	21	4	2	6	1
	<i>gga-miR-128</i>	22	0	1	0	0
	<i>gga-miR-27b</i> (68-90)	23	0	0	0	0
	<i>gga-miR-27b</i> (259-279)	21	0	1	0	0
	<i>gga-miR-200a</i>	24	0	4	3	1
	<i>gga-miR-144</i>	26	0	0	0	0
	<i>gga-miR-29a</i>	20	4	1	1	0
	<i>gga-miR-29b</i>	23	4	1	1	0
	<i>gga-miR-29c</i>	19	4	1	1	0
	<i>gga-miR-301</i>	30	0	1	1	1
IGF-III	<i>gga-miR-184</i>	20	1	3	2	2
IGF-I	<i>gga-miR-183</i>	26	1	0	1	0
IGF2R	<i>gga-miR-30d</i>	21	0	1	0	1
	<i>gga-miR-30a-3p</i>	23	2	3	4	0
	<i>gga-miR-30e</i>	23	0	1	0	1
	<i>gga-miR-211</i>	23	2	0	0	0
	<i>gga-miR-204</i>	23	2	0	0	0
	<i>gga-miR-142-5p</i>	25	4	8	5	0
IGFBP2	<i>gga-miR-130b</i>	18	3	5	3	2
	<i>gga-miR-301</i>	24	6	6	3	2
	<i>gga-miR-34b</i>	28	0	1	1	0
	<i>gga-miR-130a</i>	25	7	7	3	1
合计 Total	22	508	44	47	35	12

靶标 5 和 3 侧翼区分别搜寻到 44 个和 35 个候选 SNP, 47 个 SNP 个定位于靶标区, 其中 12 个 SNP 定位于种子序列互补区。22 个靶标、种子序列互补区总长度分别为 508 bp、154 bp(每个靶标 7 bp 长), Fisher 精确检验结果表明, 种子序列互补区与靶标区 SNP 频率差异不显著, P 值为 0.3973; 种子序列互补区与 3'UTR SNP 频率差异也不显著, P 值分别为 0.2667。

2.4 候选 MicroRNA 与靶基因的共表达分析

对“seed”序列互补区发生突变的 10 个候选 microRNA 靶标进行靶基因的共表达分析, 结果仅在孵化 3.5 d 鸡胚找到 *IGFBP2* 的 *gga-miR-130a* 靶标的表达信息, 结果见表 5。

表 5 候选 MicroRNA 与靶基因的共表达分析
Table 5 Coexpression of candidate microRNA and target gene

基因与小 RNA Gene and microRNA	体节 Somites	肢芽 Limb bud	脑 Brain
<i>IGFBP2</i>	表达 Expression	表达 Expression	表达 Expression
<i>gga-miR-130a</i>	表达 Expression	表达 Expression	表达 Expression

3 讨论

MicroRNA 具有调控生物体的生长发育、细胞程序性死亡以及新陈代谢等多种功能。据推测鸡中三分之一的基因都受到 microRNA 的调控^[1,3]。目前, 在已知 microRNA 与靶基因的相互

作用中, microRNA 5 端的 2~8 个核苷酸几乎无一例外地与靶 mRNA 3 端 UTR 区完全互补。研究者基于这一特点, 同时以 microRNA 与靶基因形成二聚体的热力学稳定性等作为限制条件开发的 microRNA 靶基因预测软件 miRanda, 其预测结果有比较高的准确性。

本文应用 miRanda 等软件对鸡 *lin-41* 3'UTR 的预测结果中包括大部分已证实的靶标^[8], 说明 miRanda 等可用于鸡 microRNA 靶标预测; 进一步对 *GDF-8* 等 6 个基因进行预测, 共发现 26 种 microRNA 的 27 个靶标, 其中 *gga-miR-27b* 在 *GDF-8* 有两个靶标。研究发现不同基因 microRNA 的靶标数存在差异: *GDF-8* 的 3'UTR 具有 9 种 microRNA 的 10 个靶标, 而 *GHR* 3'UTR 没有预测到候选靶标。造成这种现象可能原因主要有: (1) 本文仅将与 microRNA “seed”区严格碱基配对的序列作为候选靶标位点, 筛选条件严格, 舍弃了 *GHR* 部分预测结果; (2) 用于分析鸡 microRNA 的数据偏少、*GHR* 序列偏短, 使得有些靶标没有被预测到; (3) *GHR* 本身不受 microRNA 调控。

在 27 个靶标中, *GDF-8* 的 *gga-miR-27*(68~90)、*gga-miR-29* 和 *IGF2R* 的 *gga-miR-211*、*gga-miR-204* 在人、大鼠、小鼠和狗中其同源基因是保守的靶标, 其“seed”互补区的序列基本相同; 进一步对人、大鼠、小鼠和鸡的 *miR-27* 等 4 个 microRNA 比较分析发现, 其成熟体序列或完全相同或仅存在个别碱基差异, 这意味着 *GDF-8*、*IGF2R* 可能受上述 microRNA 的调控, 而且这种调控机制存在着进化上的保守性。

研究证实 microRNA 靶标 SNP 可对 microRNA 的调控作用产生重要影响, 甚至可导致其抑制功能丧失^[2,4,5]。如 Clop 等^[16]发现在 Texel 绵羊中 *GDF8* 基因由于 3 UTR 区的一个点突变产生了一个 *miR-1* 和 *miR-206* 作用的靶位点, 从而引起 microRNA 介导的 myostatin 浓度在转录后降低而造成肌肉肥大。我们利用生物信息技术进一步发掘 27 个候选靶标 SNP 位点, 共搜寻到 125 个候选 SNP 位点, 靶标 5 和 3 侧翼区分别搜寻到 44 个和 35 个候选 SNP, 47 个 SNP 个定位于靶标区, 其中 12 个 SNP 定位于种子序列互补区。最近研究表明, 靶标 3 SNP 可以影响 microRNA 与靶标的结合, 使

microRNA 抑制功能丧失。因此, 本文所发掘的变异位点, 尤其“seed”互补区和靶标 3 侧翼区的 SNP, 可能会通过影响 microRNA 与靶基因的结合来调控其表达, 进而影响家鸡的表型。

MicroRNA 靶标作为功能基因的一类重要顺式调控元件, 需要其“seed”互补区与 microRNA 严格配对, 才能实现对基因有效的表达调控。研究发现人的 microRNA 靶标“seed”互补区受到净化选择的压力, 其 SNP 发生频率明显低于整个 3 UTR^[14]。我们分析所预测靶标的“seed”互补区与靶标和 3 UTR 的 SNP 频率, 没有明显差异。这可能是由于分析所用的序列多为基因组和 EST 冗余序列, 由于所提交序列多为单向、一次测序的结果, 可能存在较多误差, 掩盖了 SNP 频率的差异。

本文试图对“seed”序列互补区发生突变的 10 个候选 microRNA 靶标进行靶基因的共表达分析, 结果仅发现 *IGFBP2* 与 *gga-miR-130* 在孵化 3.5 d 鸡胚的体节、肢芽和脑组织中均高效表达, 其他基因由于缺乏相应的表达信息分析。

本研究只是基于生物信息技术对鸡 6 个功能基因 3 UTR microRNA 靶标生物信息学预测及其候选 SNP 的搜寻进行的初步探讨, 所预测的结果还需进一步实验验证。

参考文献(References):

- [1] RAO You-Sheng, ZHANG Xi-Quan. Single nucleotide polymorphisms and fine mapping QTL in chickens. *Hereditas* (Beijing), 2007, 29(4): 393–398. [\[DOI\]](#)
饶友生, 张细权. 鸡单核苷酸多态性与高清晰度 QTL 图谱的构建. *遗传*, 29(4): 393–398.
- [2] Lei M, Luo C, Peng X, Fang M, Nie Q, Zhang D, Yang G, Zhang X. Polymorphism of growth-correlated genes associated with fatness and muscle fiber traits in chickens. *Poult Sci*, 2007, 86(5): 835–842.
- [3] Nie Q, Sun B, Zhang D, Luo C, Ishag NA, Lei M, Yang G, Zhang X. High diversity of the chicken growth hormone gene and effects on growth and carcass traits. *J Hered*, 2005, 96(6): 698–703. [\[DOI\]](#)
- [4] Bennett AK, Hester PY, Spurlock DE. Polymorphisms in vitamin D receptor, osteopontin, insulin-like growth factor 1 and insulin, and their associations with bone, egg and growth traits in a layer-broiler cross in chickens. *Anim Genet*, 37(3): 283–286.
- [5] WU Xu, WANG Jin-Yu, YAN Mei-Jiao, LI Hui-Fang, CHEN Kuan-Wei, TANG Qing-Ping, ZHU Wen-Qi, YU

- Ya-Bo. Genetic effects of *GNRHR* and *IGF-I* genes on the reproductive traits in Wenchang chicken. *Acta Vet Zootech Sin*, 2007, 38(1): 31–35.
- 吴旭, 王金玉, 严美姣, 李慧芳, 陈宽维, 汤青萍, 朱文奇, 俞亚波. *GNRHR*、*IGF-I* 基因对文昌鸡繁殖性状的遗传效应分析. 畜牧兽医学报, 2007, 38(1): 31–35.
- [6] ZHU Zhi, XU Ning-Ying, WU Deng-Jun, HUANG Li-Quan, ZHAO Xiao-Feng, ZHANG Xiang-Yu. SNP of *IGF-I* gene and its genetic effects on carcass traits in chicken. *Acta Vet Zootech Sin*, 2007, 38(10): 1021–1026.
- 朱智, 徐宁迎, 吴登俊, 黄利权, 赵晓枫, 张翔宇. 鸡 *IGF-I* 基因 SNP 及其对屠体性状的遗传效应分析. 畜牧兽医学报, 2007, 38(10): 1021–1026.
- [7] MIN Ling-Jiang, PAN Qing-Jie, CHEN Hong, LEI Chu-Chao, LI Mei-Yu, SUN Guo-Qiang. Studies of insulin-like growth factor-I (*IGF-I*) gene polymorphism analysis and its associations with body weight and carcass traits in Shouguang chicken. *Acta Vet Zootech Sin*, 2005, 36(7): 645–648.
- 闵令江, 潘庆杰, 陈宏, 雷初朝, 李美玉, 孙国强. 寿光鸡 *IGF-I* 基因多态性与体重及屠体性状关系的研究. 畜牧兽医学报, 2005, 36(7): 645–648.
- [8] ZHU Zhi, WU Deng-Jun, XU Ning-Ying. SNP of Myostatin gene and its genetic effects on carcass traits in chicken. *Hereditas(Beijing)*, 2007, 29(5): 593–598.
- 朱智, 吴登俊, 徐宁迎. 鸡 Myostatin 基因单核苷酸多态性及其对屠体性状的遗传效应分析. 遗传, 2007, 29(5): 593–598.
- [9] Amills M, Jiménez N, Villalba D, Tor M, Molina E, Cubiló D, Marcos C, Francesch A, Sánchez A, Estany J. Identification of three single nucleotide polymorphisms in the chicken insulin-like growth factor 1 and 2 genes and their associations with growth and feeding traits. *Poult Sci*, 2003, 82(10): 1485–1493.
- [10] Li ZH, Li H, Zhang H, Wang SZ, Wang QG, Wang YX, Li ZH, Li H, Zhang H, Wang SZ, Wang QG, Wang YX. Identification of a single nucleotide polymorphism of the insulin-like growth factor binding protein 2 gene and its association with growth and body composition traits in the chicken. *J Anim Sci*, 2006, 84(11): 2902–2906. [\[DOI\]](#)
- [11] Lei MM, Nie QH, Peng X, Zhang DX, Zhang XQ. Single nucleotide polymorphisms of the chicken insulin-like factor binding protein 2 gene associated with chicken growth and carcass traits. *Poult Sci*, 2005, 84(8): 1191–198.
- [12] Nie Q, Lei M, Ouyang J, Zeng H, Yang G, Zhang X. Identification and characterization of single nucleotide polymorphisms in 12 chicken growth-correlated genes by denaturing high performance liquid chromatography. *Genet Sel Evol*, 2005, 37(3): 339–360. [\[DOI\]](#)
- [13] Saunders MA, Liang H, Li WH. Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(9): 3300–3305. [\[DOI\]](#)
- [14] Chen K, Rajewsky N. Natural selection on human microRNA binding sites inferred from SNP data. *Nat Genet*, 2006, 38(12): 1452–1456. [\[DOI\]](#)
- [15] Landi D, Gemignani F, Barale R, Landi S. A catalog of polymorphisms falling in microRNA-binding regions of cancer genes. *DNA Cell Biol*, 2008, 27(1): 35–43. [\[DOI\]](#)
- [16] Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Tordoir X, Bibé B, Bouix J, Caiment F, Elsen J M, Eychenne F, Larzul C, Laville E, Meish F, Milenkovic D, Tobin J, Charlier C, Georges M. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat Genet*, 2006, 38(7): 813–818. [\[DOI\]](#)
- [17] Mishra PJ, Humeniuk R, Mishra PJ, Longo-Sorbello GS, Banerjee D, Bertino JR. A miR-24 microRNA binding-site polymorphism in dihydrofolate reductase gene leads to methotrexate resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(33): 13513–13518. [\[DOI\]](#)
- [18] Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*, 2008 36(Database issue): D154–D158. [\[DOI\]](#)
- [19] Darnell DK, Kaur S, Stanislaw S, Konieczka JH, Yatskievych TA, Antin PB. MicroRNA expression during chick embryo development. *Dev Dyn*, 2006, 235(11): 3156–3165. [\[DOI\]](#)
- [20] Sweetman D, Rathjen T, Jefferson M, Wheeler G, Smith TG, Wheeler GN, Münsterberg A, Dalmay T. FGF-4 signaling is involved in mir-206 expression in developing somites of chicken embryos. *Dev Dyn*, 2006, 235(8): 2185–2191. [\[DOI\]](#)
- [21] Lancman JJ, Caruccio NC, Harfe BD, Pasquinelli AE, Schageman JJ, Pertsemliadis A, Fallon JF. Analysis of the regulation of lin-41 during chick and mouse limb development. *Dev Dyn*, 2005, 234(4): 948–960. [\[DOI\]](#)
- [22] CHEN Wei, ZHANG Ge, ZHANG Si-Zhong. Discovery of candidate SNP by bioinformatic methods. *Hereditas (Beijing)*, 2001, 23(2): 153–156.
- 陈炜, 张戈, 张思仲. 基于生物信息学的 SNP 候选位点的搜寻方法. 遗传, 2001, 23(2): 153–156.
- [23] Yu Z, Li Z, Jolicoeur N, Zhang L, Fortin Y, Wang E, Wu M, Shen SH. Aberrant allele frequencies of the SNPs located in microRNA target sites are potentially associated with human cancers. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(13): 4535–4541. [\[DOI\]](#)
- [24] Xu H, Wang X, Du Z, Li N. Identification of microRNAs from different tissues of chicken embryo and adult chicken. *FEBS Lett*, 2006, 580(15): 3610–3616. [\[DOI\]](#)
- [25] Darnell DK, Kaur S, Stanislaw S, Davey S, Konieczka JH, Yatskievych TA, Antin PB. GEISHA: an *in situ* hybridization gene expression resource for the chicken embryo. *Cytogenet Genome Res*, 2007, 117(1-4): 30–35. [\[DOI\]](#)
- [26] Antin PB, Kaur S, Stanislaw S, Davey S, Konieczka JH, Yatskievych TA, Darnell DK. Gallus expression *in situ* hybridization analysis: a chicken embryo gene expression database. *Poult Sci*, 2007, 86(7): 1472–1477.