

梁萌萌,张子平,贾锡伟,等.拟穴青蟹 miR-34 靶基因预测及其生物信息学分析[J].渔业研究,2017,39(6):419-428.

# 拟穴青蟹 miR-34 靶基因预测及其生物信息学分析

梁萌萌<sup>1</sup>, 张子平<sup>2</sup>, 贾锡伟<sup>1</sup>, 王艺磊<sup>1\*</sup>

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021;

2. 福建农林大学动物科学学院, 福建 福州 350002)

**摘要:** MiR-34 是一类在进化过程中高度保守的 miRNA 家族, 参与机体的许多重要生命活动。本研究首先比较本实验室构建的拟穴青蟹 miRNA 数据库中的 miR-34 (spa-miR-34) 和通过 miRBase 获得的多个物种的 miR-34 的序列特征, 然后应用 RNAhybrid 和 Segal Lab 两种在线工具预测 spa-miR-34 的靶基因, 用 blast2go 软件对这些靶基因进行功能注释和信号通路富集分析。结果表明, spa-miR-34 可能的靶基因有 66 个, 这些基因的功能主要包括氧化还原、磷酸化、钙离子跨膜运输、转录等生物学过程; 信号通路主要富集于精氨酸和脯氨酸代谢、抗生素生物合成、苯丙素生物合成、糖酵解和糖异生等合成代谢通路中。spa-miR-34 预测的靶基因所涉及的基因家族和通路亦包括 CHH 家族、ERK 通路、细胞周期和 UPP 通路、SUMO 通路。此外, spa-miR-34 预测的靶基因还有蜕皮激素受体, 推测 spa-miR-34 在生殖、蜕皮及氨基酸等物质代谢方面具有重要作用。本研究为进一步了解 spa-miR-34 在拟穴青蟹中的作用提供了重要参考资料。

**关键词:** miR-34; 靶基因; 生物信息学; 拟穴青蟹

**中图分类号:** Q811.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-5601(2017)06-0419-10

MicroRNA (简称 miRNA) 是一类内源性的非编码单链小分子 RNA, 长度约 22~25 个核苷酸, 在动物中其通过与靶基因 mRNA 的 3' 非翻译区 (3' untranslated region, 3' UTR) 的不完全性互补配对, 引起转录抑制或者下调, 进而参与调控机体内多种重要的生命活动过程, 如生长发育、生殖和免疫等<sup>[1-2]</sup>。

MiR-34 是一类在进化过程中高度保守的 miRNA 家族, 且广泛存在于后生动物中<sup>[3]</sup>。越来越多的研究表明 miRNA-34 在机体生命活动中发挥着重要的作用<sup>[4]</sup>, 如参与人类癌症的发生<sup>[5-6]</sup>及衰老过程<sup>[7-8]</sup>, 但在拟穴青蟹中, 目前

对其 miRNA-34 的研究未见报道。根据拟穴青蟹 miR-34 (spa-miRNA-34) 靶基因的预测结果, 通过数据整合和应用生物信息学分析方法, 进一步挖掘理论上存在的的结果, 并对结果进行系统分析整理, 可为 spa-miR-34 靶基因的实验鉴定及其生物学功能研究提供数据支持和理论指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

spa-miR-34: 拟穴青蟹购自厦门集美农贸市场, 分别提取不同性腺发育阶段的三个眼柄的

收稿日期: 2017-11-15

基金项目: 国家自然科学基金 (41676161, 31672681, 31472266)。

作者简介: 梁萌萌 (1988-), 女, 研究生, 从事水产动物生殖生物学研究。E-mail: 1638785935@qq.com

通讯作者: 王艺磊 (1963-), 女, 教授, 从事水产动物生殖生物学研究。E-mail: ylwang@jnu.edu.cn

RNA，等量混合 RNA 分别形成雌雄眼柄 RNA 两个样品池，送至杭州联川生物技术有限公司，采用 illumina 二代测序仪进行高通量测序并通过生物信息学分析获得拟穴青蟹眼柄 miRNA 数据库，从该数据库中获得了表达量较高的 spa-miR-34。

不同物种的 miR-34：搜索 miRBase (<http://www.mirbase.org/>) 可获得不同动物的 miR-34 的成熟序列。

拟穴青蟹基因的 3'UTR：通过 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取拟穴青蟹所有已知基因的 3'UTR，用于进行靶基因的预测。

1.2 方法

通过 MEGA7 软件对本实验室高通量测序获得的 spa-miRNA-34 和 miRBase 获得的 miR-34 进行比对，分析不同物种 miR-34 的保守性。

利用 RNAhybrid ([http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid?id=rnahybrid\\_view\\_submission](http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid?id=rnahybrid_view_submission)) 和 Segal Lab (<https://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/prediction.html>) 两种通用的靶基因预测软件对 spa-miRNA-34 进行靶基因预测，取预测结果的交集。根据 miRNA 预测靶基因的原理，RNAhybrid 在线预测软件设置的参数为：种子区域第二位至第八位互补，允许 G:U 配对，最

小结合自由能(MFE)设置为 -20 kcal/mol，结合自由能越低表示 miR-34 与靶基因的 3'UTR 区结合越紧密；Segal Lab 在线预测软件设置的参数为：种子区域第二位至第八位互补，允许 G:U 配对，允许单个错配。由于拟穴青蟹属非模式生物，数据库中的基因信息不足，使用 RNAhybrid 和 Segal Lab 在线软件更加方便进行靶基因预测。

利用 blast2go (<https://www.blast2go.com/>) 中的 GO 注释和 KEGG 通路分析对 spa-miR-34 的所有靶基因进行功能注释和信号通路的富集分析。利用 blast2go 软件进行 blast 时设置的参数为：E 值为 1.0E-3。进行功能注释时的参数设置为 E 值为 1.0E-6，其他采用默认值。

2 结果与分析

2.1 miR-34 的保守性

通过搜索 miRBase 发现 miR-34 是研究比较广泛且深入的一种 miRNA，分别检索人、鼠、果蝇等 16 个物种及实验室获得的 spa-miR-34 成熟序列，利用 MEGA7 对 miRBase 数据库获得的不同物种的 miR-34 进行 ClustalW 分析，比对结果发现 17 个物种的 miR-34 序列一致性极高（表 1），表明 miR-34 在不同物种间具有高度的保守性。

表 1 不同物种的 miR-34 的成熟序列  
Tab.1 Mature sequences of miR-34 in different species

序列号 Serial number	物种 Species	名称 miRNA name	保守序列 Conservative sequence
	<i>Scylla paramamosain</i>	spa-miR-34	UGGCAGUGUGGUUUGCUGGUUGU
MIMAT0001269	<i>Danio rerio</i>	dre-miR-34	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU
MIMAT0000255	<i>Homo sapiens</i>	hsa-miR-34	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU
MIMAT0000542	<i>Mus musculus</i>	mmu-miR-34	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU
MIMAT0000350	<i>Drosophila melanogaster</i>	dme-miR-34	UGGCAGUGUGGUUAGCUGGUUGUG
MIMAT0009516	<i>Capitella teleta</i>	cte-miR-34	UGGCAGUGUGGUUAGCUGGUUGU
MIMAT0009475	<i>Branchiostoma floridae</i>	bfl-mir-34	UGGCAGUGUGGAUAGCUGGCCGUUU
MIMAT0012917	<i>Equus caballus</i>	eca-mir-34	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU
MIMAT0000005	<i>Caenorhabditis elegans</i>	cel-miR-34	AGGCAGUGUGGUUAGCUGGUUG
MIMAT0000815	<i>Rattus norvegicus</i>	rno-miR-34	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU

续表 1

序列号	物种	名称	保守序列
Serial number	Species	miRNA name	Conservative sequence
MIMAT0002494	<i>Gorilla gorilla</i>	ggo-miR-34	<u>UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU</u>
MIMAT0002495	<i>Ateles geoffroyi</i>	age-miR-34	<u>UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU</u>
MIMAT0002496	<i>Pan paniscus</i>	ppa-miR-34	<u>UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU</u>
MIMAT0002497	<i>Pongo pygmaeus</i>	ppy-miR-34	<u>UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU</u>
MIMAT0003578	<i>Xenopus tropicalis</i>	xtr-miR-34a	<u>UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU</u>
MIMAT0002499	<i>Macaca mulatta</i>	mml-miR-34	<u>UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU</u>
MIMAT0002500	<i>Saguinus labiatus</i>	sla-miR-34	<u>UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU</u>

注:红色表示完全相同的碱基,下划线表示种子序列。  
Note:The same nucleotides are in red, seed sequences are underlined.

2. 2spa-miR-34 靶基因的预测

spa-miR-34 的靶基因, 选取预测结果的交集, 得  
用 RNAhybrid 和 Segal Lab2 在线工具预测到 66 个 spa-miR-34 的靶基因 (表 2)。

表 2 2 种在线工具预测 miR-34 靶基因的交集

Tab. 2 The intersection of miR-34 target genes were predicted by two kinds of online tools

NCBI 登录号	基因全称	缩写
NCBI accession number	Gene name	Abbreviation
gi 188011192 gb EU679503.1	protein-disulfide isomerase	PDI
gi 198444890 gb FJ015041.1	cell division cycle 2	CDC2
gi 209972749 gb FJ265877.1	ubiquitin-conjugating enzyme E2	UBE2I
gi 220898728 gb FJ548926.1	cyclin H	CCNH
gi 222160394 gb FJ613627.1	Sox14 protein	Sox14
gi 225908472 gb FJ800570.1	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L3	UCHL3
gi 226423346 gb FJ812091.2	thioredoxin peroxidase	TPx
gi 260159565 gb GQ847862.1	mitogen-activated protein kinase	MAPK
gi 260586475 gb GQ892832.1	catalase	CAT
gi 260908212 gb GQ903728.1	Ras-related protein Rap-1b precursor	RAP1B
gi 262400962 gb FJ774661.1	copper/zinc superoxide dismutase	CuZnSOD
gi 262401060 gb FJ774711.1	arp2/3 complex 20 kd subunit	ARPC4
gi 262401450 gb FJ774909.1	importin alpha 2	KPNA2
gi 262401468 gb FJ774918.1	serine protease inhibitor	SPIN
gi 281372506 gb GU213434.1	cytosolic manganese superoxide dismutase precursor	eMnSOD
gi 295919776 gb HM036654.1	G protein-coupled receptor 89	GPR89
gi 302746226 gb HM988726.1	cyclin A	CCNA
gi 369725032 gb JQ327142.1	toll-like receptor	TLR
gi 374095531 gb JN655170.1	arginine kinase gene	Ak1

续表 2

NCBI 登录号	基因全称	缩写
NCBI Accession number	Gene name	Abbreviation
gi 375081799 gb FJ774773.2	serine protease	SPR
gi 375298902 gb JN828652.1	arginine kinase	Ak2
gi 377830328 gb JQ316171.1	MAP kinase-activated protein kinase 2	MAPKK
gi 380003169 gb JQ421462.1	CHH protein( C1 )	CHH( C1 )
gi 380003171 gb JQ421463.1	CHH protein( C2 )	CHH( C2 )
gi 380003173 gb JQ421464.1	14-3-3 protein	14-3-3
gi 380042037 gb JQ218935.1	14-3-3 zeta	14-3-3ζ
gi 381145578 gb JQ681527.1	leucine-rich repeat proteins	LRR
gi 381413271 gb JF769191.1	arginine kinase	Ak3
gi 383478995 gb JQ855710.1	molt-inhibiting hormone	MIH
gi 385152622 gb JQ069030.1	ALF1	ALF1
gi 387571562 gb JQ860424.1	sarcoplasmic calcium-binding protein	SCP
gi 388267610 gb JQ031765.1	arginine kinase	Ak4
gi 391092522 gb JQ867383.2	protein phosphatase 2A regulatory subunit B	PPP2R2C
gi 391226685 gb JQ812807.1	crustacean hyperglycemic hormone	CHH
gi 391234246 gb JQ855709.2	molt-inhibiting hormone 2	MIH2
gi 391234248 gb JQ855711.2	crustacean hyperglycemic hormone 2	CHH2
gi 393395459 gb JQ821373.1	ecdysteroid receptor 2	EcR2
gi 393395461 gb JQ821374.1	ecdysteroid receptor 3	EcR3
gi 396582126 gb HM352791.2	farnesoic acid O-methyltransferase intermediate isoform	FAMeT1
gi 396582127 gb HQ587049.2	farnesoic acid O-methyltransferase long isoform	FAMeT2
gi 396582128 gb HQ587050.2	farnesoic acid O-methyltransferase short isoform	FAMeT3
gi 397746025 gb JX094506.1	gamma-interferon-inducible lysosomalthiolreductase	GILT
gi 399138602 gb JX081268.1	SUMO-activating enzyme subunit 2	SUMO-2
gi 399138608 gb JX081271.1	neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 8	NEDD8
gi 399936381 gb JX104658.1	voltage-gated calcium channel beta subunit transcript variant 1	VGCCB1
gi 399936383 gb JX104659.1	voltage-gated calcium channel beta subunit transcript variant 2	VGCCB2
gi 399936385 gb JX104660.1	voltage-gated calcium channel beta subunit transcript variant 3	VGCCB3
gi 399936389 gb JX104662.1	voltage-gated calcium channel beta subunit transcript variant 5	VGCCB5
gi 401063443 gb JX268543.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1	GAPDH1
gi 402485601 gb JX257000.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase2	GAPDH2
gi 408690851 gb JX094504.1	macrophage migration inhibitory factor1	MIF1
gi 414073165 gb JQ863320.1	thioredoxin	TXN
gi 432332884 gb JX131610.1	macrophage migration inhibitory factor2	MIF2

续表 2

NCBI 登录号	基因全称	缩写
NCBI Accession number	Gene name	Abbreviation
gi 442540096 gb JX987068.1	heat shock protein 90	HSP90
gi 443614326 gb JQ864188.1	clone PXQ014G02 thioredoxin 1	TXN 1
gi 507118478 gb KC685376.1	antimicrobial peptide hyastatin	AMPH
gi 522209736 gb KC750206.1	crustacean hyperglycemic hormone 3	CHH3
gi 1122822121 gb KC817503.2	red pigment concentrating hormone	RPCH
gi 552968763 gb KF155698.1	pelle-like kinase	Pelle
gi 576250968 gb KC711049.1	cytokine receptor	CR
gi 576250985 gb KC711050.1	signal transducer and activator of transcription	STAT
gi 748203607 gb KM189809.1	glutamate dehydrogenase	GDH
gi 906542615 gb KJ728649.1	gamma-interferon induced thiolreductase1	GILT1
gi 906542662 gb KJ728653.1	gamma-interferon induced thiolreductase 3	GILT3
gi 908301803 gb KJ728659.1	macrophage migration inhibitory factor3	MIF3
gi 924658744 gb KP979704.1	14-3-3 protein isoform B	14-3-3B

2.3 spa-miR-34 靶基因的 GO 分析

为进一步认识 spa-miR-34 的靶基因，对集合中的 66 个基因进行 GO 分类富集分析，GO 注释得到 56 个基因的 GO 生物学过程注释信息，

将这 56 个基因投到 GO 的生物学过程上，结果发现 spa-miR-34 的靶基因主要富集于氧化还原过程、磷酸化过程、钙离子跨膜运输、转录等生物学过程（表 3）。

表 3 spa-miR-34 预测靶基因 GO 生物学过程分析  
Tab.3 GO biological process analysis of predicted targets of spa-miR-34

GO 号	生物学过程	基因数量	基因名称
GO number	Biological process	Number of gene	Gene name
GO:0055114	Oxidation-reduction process	9	cMnSOD, TXN, TXN 1, CuZnSOD, TPx, CAT ,GDH, GAPDH1 ,GAPDH2
GO:0016310	Phosphorylation	4	Ak1 , Ak2, Ak3 , Ak4
GO:0070588	Calcium ion transmembrane transport	4	CACNB41 ,CACNB42 ,CACNB43 ,CACNB45
GO:0006351	Transcription ,DNA-templated	4	CCNH, EcR2 ,EcR3 ,STAT
GO:0045454	Cell redox homeostasis	3	PDI, TXN, TXN 1
GO:0006457	Protein folding	3	TXN, HSP90, TXN 1
GO:0006468	Protein phosphorylation	3	CDC2, MAPKK, PLL
GO:0006355	Regulation of transcription, DNA-templated	3	EcR2, EcR3 ,STAT
GO:0032259	Methylation	3	FAMeT1M, FAMeT2 ,FAMeT3
GO:0005975	Carbohydrate metabolic process	2	CHH( C2) ,CHH
GO:0006662	Glycerol ether metabolic process	2	TXN, TXN 1
GO:0007218	Neuropeptide signaling pathway	2	MIH ,MIH2

续表 3

GO 号	生物学过程	基因数量	基因名称
GO number	Biological process	Number of gene	Gene name
GO:0044699	Single-organism process	2	CHH(C2),CHH
GO:0098869	Cellular oxidant detoxification	2	TPx,CAT
GO:0019430	Removal of superoxide radicals	2	cMnSOD,CuZnSOD
GO:0035076	Ecdysone receptor-mediated signaling pathway	2	EcR2,EcR3
GO:0006508	Proteolysis	2	SPIN,SPR
GO:0034599	Cellular response to oxidative stress	2	TXN,TXN 1
GO:0007165	Signal transduction	2	TLR,STAT
GO:0006096	Glycolytic process	2	GAPDH1,GAPDH2
GO:0016925	Protein sumoylation	2	UBE2I,SUMO-2
GO:0006006	Glucose metabolic process	2	GAPDH1,GAPDH2
GO:0000103	Sulfate assimilation	2	TXN,TXN 1
GO:0042744	Hydrogen peroxide catabolic process	1	CAT
GO:0006520	Cellular amino acid metabolic process	1	GDH
GO:0006607	NLS-bearing protein import into nucleus	1	KPNA2
GO:0034314	Arp2/3 complex-mediated actin nucleation	1	ACTR2
GO:0000165	MAPK cascade	1	MAPK
GO:0042742	Defense response to bacterium	1	ALF1
GO:0007264	Small GTPase mediated signal transduction	1	RAP1B
GO:0051301	Cell division	1	CDC2
GO:0035556	Intracellular signal transduction	1	PLL
GO:0006979	Response to oxidative stress	1	CAT
GO:0030041	Actin filament polymerization	1	ACTR2
GO:0006511	Ubiquitin-dependent protein catabolic process	1	UCHL3
GO:0006950	Response to stress	1	HSP90
GO:0045859	Regulation of protein kinase activity	1	CCNH
GO:0008063	Toll signaling pathway	1	PLL

2.4 miR-34 靶基因的 KEGG 分析

在 GO 注释分类的基础上，利用已有生物通路数据，对基因集合中的 66 个基因进行生物通路富集分析。结果显示：在经典通路数据库

KEGG 中 Spa-miR-34 预测靶基因集合显著富集于精氨酸和脯氨酸代谢通路、生物合成抗生素通路、苯丙素生物合成通路、糖酵解和糖异生等通路（表 4）。

表 4 spa-miR-34 预测靶基因的通路分析  
Tab. 4 Pathway analysis of predicted targets of spa-miR-34

KEGG 通路	基因数量	基因名称
KEGG pathways	Number of gene	Gene name
Arginine and proline metabolism	4	Ak1 , Ak2, Ak3 , Ak4 ,
Biosynthesis of antibiotics	3	CAT ,GAPDH1 ,GAPDH2
Phenylpropanoid biosynthesis	2	CAT ,TPx
Glycolysis/Gluconeogenesis	2	GAPDH2 ,GAPDH1
mTOR signaling pathway	1	MAPK
Nitrogen metabolism	1	GDH
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	1	CAT
Glutathione metabolism	1	TPx
Tryptophan metabolism	1	CAT
D-Glutamine and D-glutamate metabolism	1	GDH
Arginine biosynthesis	1	GDH
Alanine ,aspartate and glutamate metabolism	1	GDH
Taurine and hypotaurine metabolism	1	GDH

3 讨论

靶基因 mRNA 的 3’ 端 UTR 区和 miRNA5’ 端第 2 ~8 位碱基完全互补，这 7 个碱基序列称作“miRNA 种子区”<sup>[3]</sup>。MiR-34 作为进化上较为保守的转录后调控因子，一定程度地表现在与靶基因进行识别的“种子序列”中<sup>[9]</sup>。“种子序列”的保守性较高可能反映出 miR-34 在物种演化过程中始终扮演着重要的角色。本实验室前期在性腺 miRNA 组的测序中获得了 spa-miR-34，关于 miR-34 靶基因的研究及验证，多集中在高等动物中，在水产无脊椎动物中尚未涉及。在人类中 miR-34 的靶基因有 E2F2<sup>[10]</sup> NumbL<sup>[11]</sup>、Notch1<sup>[11]</sup>、OCT4<sup>[12]</sup>、DLL1<sup>[13]</sup>、IGFBP-3 等<sup>[14]</sup>。在蜜蜂中的靶基因有 eve、ftz - fl 和 act5C<sup>[15]</sup>。

通过生物信息学方法预测 spa-miR-34 靶基因，对 spa-miR-34 靶基因进行功能富集分析，发现其靶基因的功能主要富集于氧化还原、磷酸化、钙离子跨膜运输、转录等生物学过程中。其中富集最多的是抗氧化系统中的抗氧化酶基因，如 cMnSOD、CuZnSOD、CAT 等，说明 spa-miR-34 可能参与拟穴青蟹的抗氧化防御过程。对 spa-miR-34 靶基因进行生物通路分析，发现信

号通路主要富集于精氨酸和脯氨酸代谢、抗生素生物合成、苯丙素生物合成、糖酵解和糖异生等合成代谢通路中，说明 spa-miR-34 可能参与氨基酸等物质代谢过程。

spa-miR-34 预测的靶基因所涉及的基因家族和通路亦包括 CHH 家族（CHH，MIH）<sup>[16]</sup>、ERK 通路（MAPK，MAPKK，STAT，14-3-3）<sup>[17-19]</sup>、细胞周期和 UPP 通路（cyclinA，cyclinH，CDC2，UBE2I）<sup>[20-21]</sup>、SUMO 通路（SUMO-2）<sup>[22-23]</sup>。CHH 家族神经肽是调节甲壳动物生长发育、生殖、蜕皮等生理过程的重要激素，例如 CHH 可以刺激卵黄发生，促进生殖<sup>[24]</sup>，MIH 不仅调控蜕皮的发生，也能促进性腺的发育<sup>[24-25]</sup>。ERK 通路在卵母细胞减数分裂、受精、胚胎发育、细胞凋亡、突触可塑性和记忆形成等时期均起作用<sup>[26]</sup>。ERK 通路在甲壳动物性腺发育中的作用已逐渐被认识<sup>[17,27]</sup>。细胞周期和 UPP 通路涉及机体的各种基本生理过程，在精子发生、成熟，受精，卵母细胞减数分裂，卵子发生，早期胚胎发育，性腺发育等阶段均有作用<sup>[28]</sup>。例如，CDC2 和 cyclin B 参与了拟穴青蟹性腺发育<sup>[21]</sup>，UBE2I 在小鼠卵母细胞基因表达中起 SUMO 化的作用<sup>[29]</sup>。SUMO 通路在卵母细

胞减数分裂<sup>[30]</sup>、转录活性调控、核质转运、细胞周期调控、DNA 的复制与修复以及信号的转导<sup>[31]</sup>等方面发挥重要作用。戴燕彬<sup>[32]</sup>研究发现拟穴青蟹 SUMO 通路在卵巢的早期发育、配子发生过程亦起重要作用。预测的靶基因涉及以上通路,说明 spa-miR-34 在生殖方面可能起重要作用。

此外,spa-miR-34 预测的靶基因还有蜕皮激素受体 (EcR),它是蜕皮激素的作用靶标,因此,spa-miR-34 可能也参与拟穴青蟹的蜕皮过程。

由于拟穴青蟹属非模式生物,数据库中的基因信息不足,无法进行更深入的挖掘,相信随着拟穴青蟹基因在数据库中的丰富,spa-miR-34 的作用会获得更深入的阐释。通过对 miR-34 靶基因进行生物通路分析,可以从调控网络层面挖掘 miR-34 的调控机制,看到基因层面看不到的信息,从而在调控层面更全面地了解 miR-34 的生物学功能,对了解 miR-34 对拟穴青蟹的调控机制奠定基础。但所预测的 miR-34 靶基因在拟穴青蟹中是否为 miR-34 的直接靶基因或间接靶基因需要进一步实验验证,目前本实验室正在进行相关的工作。

## 参考文献:

- [1] Hwang H W, Mendell J T. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis [J]. British Journal of Cancer, 2006, 94 (6): 776 - 780.
- [2] 王天宇,董园园,李海燕,等. MicroRNAs 的分子进化与调控机制 [J]. 遗传, 2010, 32 (9): 277 - 279.
- [3] 高佳莉,罗玉萍,李思光. miR-34 基因家族的分子进化 [J]. 动物学研究, 2007, 28 (3): 271 - 278.
- [4] Engkvist M E, Stratford E W, Lorenz S, et al. Analysis of the miR-34 family functions in breast cancer reveals annotation error of miR-34b [J]. Scientific Reports, 2017, 7 (1): 9655.
- [5] Hermeking H. The miR-34 family in cancer and apoptosis [J]. Cell Death and Differentiation, 2010, 17 (2): 193 - 199.
- [6] Slabáková E, Culig Z, Remšík J, et al. Alternative mechanisms of miR-34a regulation in cancer [J]. Cell Death and Disease, 2017, 8 (10): e3100.
- [7] Liu N, Landreh M, Cao K, et al. The microRNA miR-34 modulates ageing and neurodegeneration in Drosophila [J]. Nature, 2012, 482 (7386): 519 - 523.
- [8] Aw S, Cohen S M. Time is of the essence: microRNAs and age-associated neurodegeneration [J]. Cell Research, 2012, 22 (8): 1218 - 1220.
- [9] Grimson A, Farh K K, Johnston W K, et al. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing [J]. Molecular Cell, 2007, 27 (1): 91 - 105.
- [10] Pulikkan J A, Peramangalam P S, Dengler V, et al. C/EBP $\alpha$  regulated microRNA-34a target E2F3 during granulopoiesis and is down-regulated in AML with CEBPA mutations [J]. Blood, 2010, 116 (25): 5638 - 5649.
- [11] Mollinari C, Racaniello M, Berry A, et al. MiR-34a regulates cell proliferation, morphology and function of newborn neurons resulting in improved behavioural outcomes [J]. Cell Death and Disease, 2015, 6 (1): e1622.
- [12] Ng W L, Chen G, Wang M, et al. OCT4 as a target of miR-34a stimulates p63 but inhibits p53 to promote human cell transformation [J]. Cell Death and Disease, 2014, 5 (1): e1024.
- [13] Pu Y, Zhao F, Wang H, et al. MiR-34a-5p promotes multi-chemoresistance of osteosarcoma through down-regulation of the DLL1 gene [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 44218.
- [14] Yin H, Zhang S, Sun Y, et al. MicroRNA-34/449 targets IGFBP-3 and attenuates airway remodeling by suppressing Nur77-mediated autophagy [J]. Cell Death and Disease, 2017, 8 (8): e2998.
- [15] Freitas F C, Pires C V, Claudianos C, et al. MicroRNA-34 directly targets pair-rule genes and cytoskeleton component in the honey bee [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 40884.
- [16] 王晓伟,张子平,王艺磊,等. 虾蟹类卵巢发育调节机制研究进展 [J]. 生物技术通报, 2013, (7): 29 - 35.
- [17] Ma A N, Wang Y L, Zou Z H, et al. Erk2 in ovarian development of green mud crab *Scylla paramamosain* [J]. DNA and Cell Biology, 2012, 31 (7): 1233 - 1244.
- [18] 马阿妮. ERK 信号转导通路相关基因在拟穴青蟹卵巢发育中的作用研究 [D]. 厦门:集美大学,



- 2011.
- [19] 王晓伟. 调控拟穴青蟹卵巢发育的眼柄转录组学分析 [D]. 厦门: 集美大学, 2013.
- [20] Zou Z H, Zhang Z P, Wang Y L, et al. EST analysis on the gonad development related organs and microarray screen for differentially expressed genes in mature ovary and testis of *Scylla paramamosain* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 2011, 6 (2): 150–157.
- [21] Han K H, Wang Y L, Zhang Z P, et al. Molecular characterization and expression profiles of cdc2 and cyclin B during oogenesis and spermatogenesis in green mud crab (*Scylla paramamosain*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology, 2012, 163 (3–4): 292–302.
- [22] Dai Y B, Wang Y L, Zhang Z P, et al. SUMO-1 of mud crab (*Scylla paramamosain*) in gametogenesis [J]. Gene, 2012, 503 (2): 260–268.
- [23] Gao J, Wang Y L, Zhang Z P, et al. Transcriptome analysis of the differences in gene expression between testis and ovary in green mud crab (*Scylla paramamosain*) [J]. BMC Genomics, 2014, 15 (1): 585.
- [24] Zmora N, Trant J, Zohar Y, et al. Molt-inhibiting hormone stimulates vitellogenesis at advanced ovarian developmental stages in the female blue crab, *Callinectes sapidus* 1: an ovarian stage dependent involvement [J]. Saline Systems, 2009, 5 (1): 7.
- [25] Tiu S H K, Chan S M. The use of recombinant protein and RNA interference approaches to study the reproductive functions of a gonad-stimulating hormone from the shrimp *Metapenaeus ensis* [J]. The FEBS Journal, 2007, 274 (17): 4385–4395.
- [26] 马阿妮, 王艺磊, 张子平, 等. MAPK 信号途径及其在水生无脊椎动物的研究进展 [J]. 生命科学, 2010, 22 (10): 979–984.
- [27] Devaraj H, Saravanakumar M, Thiyagu M. Induction of ovarian maturation in *Penaeus monodon* by molecular signal interventional approach [J]. Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution, 2012, 318 (7): 572–585.
- [28] 韩坤煌, 张子平, 王艺磊, 等. Cyclin-CDK-CKI 及 UPP 参与生殖调控及在甲壳动物性腺发育中的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2010, (7): 49–54.
- [29] Ihara M, Stein P, Schultz R M. UBE2I (UBC9), a SUMO-conjugating enzyme, localizes to nuclear speckles and stimulates transcription in mouse oocytes [J]. Biology of Reproduction, 2008, 79 (5): 906–913.
- [30] 袁一峰. SUMO-1 在小鼠卵母细胞减数分裂中的作用及其分子机制研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
- [31] 陈玲. Sumo 信号通路对 DAPK 蛋白表达的调控 [D]. 福州: 福建师范大学, 2016.
- [32] 戴燕彬. SUMO 化信号通路相关基因在拟穴青蟹性腺发育过程中的作用研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2012.

## Prediction and bioinformatic analysis of miR-34 target genes in *Scylla paramamosain*

LIANG Mengmeng<sup>1</sup>, ZHANG Ziping<sup>2</sup>, JIA Xiwei<sup>1</sup>, WANG Yilei<sup>1\*</sup>

(1. College of Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. College of Animal Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** MiR-34 is a family of microRNAs that is highly conserved in evolution and is involved in many important life activities. In this study, the sequences characteristics between spa-miR-34 of *Scylla paramamosain* from the database constructed by our laboratory and miR-34 of other animals from the miRBase were compared, and then the spa-miR-34 target genes were predicted by two online tools: RNAhybrid and Segal Lab. The functional annotation and signal pathway enrichment of these target genes were analyzed by using blast2go software. The results showed that the number of the predicted pa-miR-34 target gene was 66, and the functions of these genes are mainly distributed in the biological processes of oxidation-reduction, phosphorylation, calcium ion transmembrane transport, transcription, etc. Signal pathways related to these genes are mainly concentrated in the metabolism of arginine and proline metabolism, antibiotic biosynthesis, phenylpropanoid biosynthesis, glycolysis and glycogenolysis, and other synthetic metabolic pathways. The predicted gene family and pathways of the spa-miR-34 target genes also include CHH family, ERK pathway, cell cycle and UPP pathway, and SUMO pathway. In addition, ecdysteroid receptor gene was also one of the predicted target genes. It is speculated that spa-miR-34 plays an important role in the reproduction, molt and the metabolism of amino acids and other substances. This study provides an important reference for further understand the role of spa-miR-34 in *S. paramamosain*.

**Key words:** miR-34; target genes; bioinformatics; *Scylla paramamosain*