



ISSN 0578-1752
CODEN CKNYAR

中国农业科学

SCIENTIA AGRICULTURA SINICA

第 53 卷 第 15 期

Vol. 53 No. 15

2020



中国农业科学院
中国农学会

主办

植物保护

3095-3107

小麦、玉米两熟秸秆还田土壤中6种有机酸对小麦纹枯病的化感作用

赵绪生 齐永志 闫翠梅 甄文超

doi: 10.3864/j.issn.0578-1752.2020.15.010

3108-3119

白背飞虱酚氧化酶原 *PPO* 基因特性及其免疫应答

张道伟 康奎 余亚娅 匡富萍 潘碧莹 陈静 唐斌

doi: 10.3864/j.issn.0578-1752.2020.15.011

土壤肥料·节水灌溉·农业生态环境

3120-3133

中国玉米主产区土壤养分的空间变异及影响因素分析

赵晴月 许世杰 张务帅 张哲 姚智 陈新平 邹春琴

doi: 10.3864/j.issn.0578-1752.2020.15.012

3134-3145

畜禽养殖废弃物堆肥过程中微生物除臭研究进展

魏启航 任艳芳 何俊瑜 李兆君

doi: 10.3864/j.issn.0578-1752.2020.15.013

园艺

3146-3157

应用 GST pull-down 技术筛选番茄 *SIVQ6* 互作蛋白

原贵波 莫双榕 钱莹 臧栋楠 杨帆 蒋红亮 武媛 丁海东

doi: 10.3864/j.issn.0578-1752.2020.15.014

3158-3168

葡萄钾离子通道基因 *VviSKOR* 的克隆、表达及电生理功能

沈静沅 唐美玲 杨庆山 高雅超 刘万好 程杰山 张洪霞 宋志志

doi: 10.3864/j.issn.0578-1752.2020.15.015

畜牧·兽医·资源昆虫

3169-3179

靶向猪内质网应激通路的 microRNAs 预测与验证

朱静静 周晓龙 汪涵 李向臣 赵阿勇 杨松柏

doi: 10.3864/j.issn.0578-1752.2020.15.016

3180-3186

松针多糖对鸡巨噬细胞 HD11 的天然免疫调节

崔小珍 栾艳 李婷婷 杨裕 关文超 张凯 王福传 宋献艺

doi: 10.3864/j.issn.0578-1752.2020.15.018

3187-3204

微小 RNA 介导东方蜜蜂微孢子虫感染意大利蜜蜂工蜂的分子机制

耿四海 石彩云 范小雪 王杰 祝智威 蒋海宾 范元婵 陈华枝 杜宇 王心蕊 熊翠玲 郑燕珍 付中民 陈大福 郭睿



靶向猪内质网应激通路的 microRNAs 预测与验证

朱静静, 周晓龙, 汪涵, 李向臣, 赵阿勇, 杨松柏

(浙江农林大学动物科技学院/浙江省畜禽绿色生态健康养殖应用技术研究重点实验室, 浙江临安 311300)

摘要: 【目的】预测并验证靶向猪内质网应激通路中关键基因的 microRNAs (miRNAs), 为进一步研究 miRNAs 对猪内质网应激信号通路调控提供理论基础。【方法】首先利用伪狂犬病毒 (PRV) 感染猪肾上皮 (PK15) 细胞, 高通量测序检测差异表达的 miRNAs。然后通过 TargetScan 预测靶向内质网应激通路关键基因 *ATF6*、*IRE1*、*PERK*、*GRP78*、*XBP1* 的 miRNAs。构建含有候选 miRNAs 作用位点的双荧光素酶报告基因重组载体, 并分别与 miRNA-mimics 共转染幼仓鼠肾 (BHK-21) 细胞, 通过测定荧光素酶活性来验证内质网应激通路关键基因与候选 miRNAs 的靶标关系。然后在 PK15 细胞中分别过表达候选 miRNAs, 利用 qRT-PCR 和 Western blot 检测候选 miRNAs 对内质网应激通路关键基因 mRNA 和蛋白表达的影响。【结果】miRNA 测序结果显示, PRV 感染后共引起 35 条 miRNAs 差异表达。TargetScan 预测显示, 靶向 *ATF6*、*IRE1*、*PERK*、*GRP78*、*XBP1* 的交集 miRNAs 为 miR-142-5p、miR-145-5p、miR-150 和 miR-199a-5p, 并将这些交集 miRNAs 作为候选 miRNAs。随后成功构建 psiCHECK-2-ATF6-m142-3'UTR、psiCHECK-2-ATF6-m145-3'UTR、psiCHECK-2-ATF6-m150-3'UTR、psiCHECK-2-ATF6-m199-3' UTR、psiCHECK-2-IRE1-m150-3'UTR、psiCHECK-2-IRE1-m142/145/199-3'UTR、psiCHECK-2-PERK-m145/150-3'UTR、psiCHECK-2-XBP1-m142/145/150/199-3'UTR、psiCHECK-2-GRP78-m145/199-3'UTR 双荧光素酶报告基因载体。双荧光素酶检测结果显示, miR-142-5p 显著抑制 psiCHECK-2-ATF6-m142-3'UTR 荧光素酶活性。psiCHECK-2-IRE1-m142/145/199-3'UTR 分别与 miR-142-5p mimics、miR-145-5p mimics、miR-199a-5p mimics 共转染, 以及 psiCHECK-2-XBP1-m142/145/150/199-3' UTR 分别与 miR-142-5p mimics、miR-199a-5p mimics 共转染, 过表达组的荧光素酶活性均极显著低于阴性对照组。同时 miR-145-5p 能够显著抑制 psiCHECK-2-PERK-m145/150-3' UTR 荧光素酶活性。这些结果表明 miR-142-5p、miR-145-5p 和 miR-199a-5p 均有可能分别靶向 *ATF6*、*IRE1*、*XBP1*, 而其中 miR-142-5p 可能同时靶向这三个关键基因调控内质网信号通路。通过 qRT-PCR 和 Western blot 分析发现, 过表达 miR-142-5p 后显著抑制 *ATF6* 的 mRNA 和蛋白表达, 表明 miR-142-5p 靶向 *ATF6* 参与调控内质网应激信号通路。【结论】验证了靶向内质网应激通路关键基因 *ATF6* 的 miRNA- miR-142-5p, 为进一步研究 miR-142-5p 通过调控 *ATF6* 的表达而影响内质网应激信号通路奠定了基础。

关键词: 猪; 内质网应激通路; miRNA; *ATF6*

Prediction and Verification of MicroRNAs Targeting Porcine Endoplasmic Reticulum Stress Pathway

ZHU JingJing, ZHOU XiaoLong, WANG Han, LI XiangChen, ZHAO AYong, YANG SongBai

(College of Animal Science and Technology, Zhejiang A&F University/Key Laboratory of Applied Technology on Green-Eco-Healthy Animal Husbandry of Zhejiang Province, Lin'an 311300, Zhejiang)

收稿日期: 2019-08-30; 接受日期: 2020-03-11

基金项目: 浙江省自然科学基金 (LY19C170002)

联系方式: 朱静静, E-mail: 2018120012009@stu.zafu.edu.cn. 通信作者杨松柏, E-mail: sbyang@zafu.edu.cn

Abstract: 【Objective】 This study was aimed to predict and validate microRNAs (miRNAs) that targeting key genes in the porcine endoplasmic reticulum (ER) stress pathway, so as to provide a theoretical basis for regulation of porcine ER stress signaling pathway by miRNAs. 【Method】 Firstly, the differential expression of miRNAs in PRV-infected PK15 cells in porcine ER were determined by high-throughput sequencing. TargetScan was used to predict miRNAs that targeting the genes *ATF6*, *IRE1*, *PERK*, *GRP78*, and *XBP1* of ER stress pathways. Recombinant plasmids were constructed, including candidate miRNA target sites, and the regulation of *ATF6*, *IRE1*, *PERK*, *GRP78*, and *XBP1* by candidate miRNAs was validated by co-transfecting dual-luciferase reporter gene vector construct with miRNA-mimics into BHK-21 cells. Then, the candidate miRNAs were over-expressed in PK15 cells, and then fluorescent quantitative PCR and Western blot were used to detect the effect of miRNAs on key genes expression at mRNA and protein levels. 【Result】 MiRNA sequencing results showed that 35 differential expression of miRNAs were determined in PRV-infected PK15 cells. The results of TargetScan prediction showed that the intersection of miRNAs targeting four or more genes of *ATF6*, *IRE1*, *PERK*, *GRP78*, and *XBP1* were miR-142-5p, miR-145-5p, miR-150, and miR-199a-5p, and these intersections of miRNAs were selected as candidate miRNAs. The dual-luciferase reporter plasmids psiCHECK-2-ATF6-m142-3'UTR, psiCHECK-2-ATF6-m145-3'UTR, psiCHECK-2-ATF6-m150-3'UTR, psiCHECK-2-ATF6-m199-3'UTR, psiCHECK-2-IRE1-m150-3'UTR, psiCHECK-2-IRE1-m142/145/199-3'UTR, psiCHECK-2-PERK-m145/150-3'UTR, psiCHECK-2-XBP1-m142/145/150/199-3'UTR, psiCHECK-2-GRP78-m145/199-3'UTR were successfully constructed. The luciferase assay experiments showed that miR-142-5p mimics could significantly inhibit luciferase activity of psiCHECK-2-ATF6-m142-3'UTR dual-luciferase reporter recombinant vector. psiCHECK-2-IRE1-m142/145/199-3'UTR was co-transfected with miR-142-5p mimics, miR-145-5p mimics, and miR-199a-5p mimics, respectively. The luciferase activity of the over-expressing group were significantly lower than the negative control group. In addition, psiCHECK-2-XBP1-m142/145/150/199-3'UTR was co-transfected with miR-142-5p mimics and miR-199a-5p mimics, respectively, and the luciferase activity of the over-expressing group were also significantly lower than the negative control group. The luciferase assay experiments showed that miR-145-5p mimics could significantly inhibit luciferase activity of psiCHECK-2-PERK-m145/150-3'UTR dual-luciferase reporter recombinant vector. The results indicated that miR-142-5p, miR-145-5p and miR-199a-5p might targeted the genes *ATF6*, *IRE1*, and *XBP1*. Among them, miR-142-5p might target these three key genes to regulate the ER signaling pathway. Overexpression of miR-142-5p significantly down-regulated the levels of mRNA and protein by qRT-PCR and Western blot methods. The results showed that miR-142-5p might participate in the regulation of ER signaling pathway by targeting *ATF6*. 【Conclusion】 In this study, miR-142-5p was validated to target the key gene *ATF6* of the porcine ER stress pathway. Thereby, these results laid a foundation for further study of regulation of ER stress pathway through miR-142-5p-*ATF6* gene axis.

Key words: pig; endoplasmic reticulum stress signaling pathway; miRNA; *ATF6*

0 引言

【研究意义】猪内质网应激过强或持续时间过长会导致一系列疾病的发生,给养猪业造成巨大经济损失。内质网应激是一个复杂的调节过程,因此,从不同角度深入研究猪内质网应激通路至关重要。本研究通过生物信息学和试验方法预测和验证靶向内质网应激通路关键基因的 miRNAs,对进一步研究转录后水平调控内质网应激通路具有重要的意义。【前人研究进展】内质网是由细胞内膜构成的网膜系统,主要参与蛋白质合成、转运、折叠、以及脂质和类固醇合成^[1-2]。当细胞受到内源性和外源性刺激时,内质网会发生未折叠蛋白或错误折叠蛋白累积,诱导内质网应激(ERS)^[3]。在 ERS 过程中,细胞会产生相应的应答措施,激活未折叠蛋白反应(UPR),减少未折叠蛋白的积累,以恢复内质网的内稳态^[4]。内质网启动

UPR 受到 ATF6、IRE1、PERK 三条信号传导途径的调控^[5]。正常情况下,内质网膜上的 ATF6、IRE1、PERK 跨膜蛋白与内质网腔内的内稳态感受器葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 结合,形成稳定的复合物,UPR 处于失活状态。当未折叠蛋白或错误折叠蛋白累积时,GRP78 与 ATF6、IRE1、PERK 解离,并与未折叠蛋白或错误折叠蛋白结合,激活三种跨膜蛋白,并启动 UPR 的 ATF6、IRE1、PERK 信号通路,从而维持内质网内稳态^[6-8]。同时,激活的 IRE1 通过剪切 XBP1 的 mRNA 内含子,使有转录活性的 XBP1s 表达,XBP1s 能够促进内质网分子伴侣和蛋白折叠相关基因的表达,促进内质网正确折叠能力^[9]。研究表明,一定程度 ERS 有利于增强细胞应对刺激能力,而过强或持续的 ERS 会导致内质网的内稳态失调,诱导炎症^[10]、细胞自噬^[11]、细胞凋亡^[12]、胰岛素抵抗^[13]等一系列反应的发生。在猪养殖过程中,病毒感染^[14-15]是引起猪 ERS

的关键因素。本课题组前期研究结果显示, PRV 感染 PK15 细胞后, PRV 能够激活 ERS 通路^[16-17]。miRNA 通过抑制靶基因 mRNA 翻译或诱导靶基因 mRNA 降解, 来调控靶基因的表达。关于 miRNA 靶向调节 ERS 通路的机制在人类疾病方面已有研究。miR-30d、miR-181a、miR-199a 协同作用能够有效抑制 GRP78 表达水平和 GRP78 介导的化学耐药^[18]。miR-145、miR-221 和 miR-494 在支气管上皮细胞中调控 ATF6^[19], 在小鼠中 miR-702 也调控 ATF6 表达^[20]。参与 UPR 调控的 miRNA 还包括 miR-122 和 miR-30c-2-3p^[21-22]。

【本研究切入点】随着高通量 miRNA 测序技术的飞速发展, 大量新的 miRNA 被陆续发现, 靶向不同基因 miRNA 的预测和验证就显得尤为重要。然而, 靶向猪 ERS 通路的 miRNA 调节机制尚不清楚。【拟解决的关键问题】研究 miRNA 对猪 ERS 通路关键基因的表达调控作用, 为后续从转录后水平研究调控 ERS 的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

本试验于 2019 年 2—8 月在浙江农林大学动物遗传育种与繁殖实验室完成。

1.1 试验材料

细胞和病毒株: PK15 细胞系和 BHK-21 细胞系购自中国典型培养物保藏中心(武汉大学); PRV(浙江株)由浙江省农业科学院畜牧兽医研究所张存研究员惠赠。

主要试剂: psiCHECK-2 质粒、双荧光素酶检测试剂盒均购自美国 Promega 公司; T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Not* I、*Xho* I 购自美国 Thermo 公司; miRNA-mimics 序列由上海吉玛制药技术有限公司合成; LipofectamineTM 3000 购自美国 Invitrogen 公司; 琼脂糖凝胶回收试剂盒、无内毒素质粒中提试剂盒、2×Taq PCR MasterMix、EasyQuick RT MasterMix 反转录试剂、BCA 试剂盒均购自北京康为世纪生物科技有限公司; 荧光定量试剂 SYBR[®] Primix Ex TaqTM II 购自宝日生物技术有限公司; 疏水性 PVDF 膜购自杭州诺扬生物技术有限公司; 脱脂奶粉购自美国 BD 公司; ATF6 多克隆抗体购自 Abclonal 公司; β -Actin 鼠源单克隆抗体购自 Proteintech 公司; HRP 标记的羊抗鼠 IgG、HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体均购自 Abbkine 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 病毒接种与 miRNA 测序

PK15 细胞接种 6 cm

培养皿, 细胞汇合度 80% 时接种 PRV (TCID₅₀=10^{-6.625}/0.1 mL) 20 μ L, 同时设空白细胞对照(Control)。感染 12 h 后收集细胞提取 RNA 进行测序。miRNA 测序试验是由北京博奥晶典生物技术有限公司完成。利用 illumina 测序平台对空白对照和 PRV 感染的细胞进行测序, 分析其 miRNAs 表达差异。

1.2.2 靶向内质网通路的 miRNA 预测和分析 利用 TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) 在线预测和分析靶向 *ATF6*、*PERK*、*IRE1*、*GRP78*、*XBPI* 的 miRNA, 并预测其 3'UTR 区可能的作用位点, 通过韦恩图 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/>) 取其交集 miRNA。miRBase (<http://www.mirbase.org/>) 数据库查询并下载 miRNA 成熟序列, 并分析其保守性。

1.2.3 双荧光素酶报告基因载体的构建 根据交集 miRNA 识别并结合靶基因 *ATF6* (Genbank 登录号: XM_021089515.1)、*PERK* (Genbank 登录号: XM_003124925.4)、*IRE1* (Genbank 登录号: XM_005668695.3)、*GRP78* (Genbank 登录号: XM_001927795.7) 和 *XBPI* (Genbank 登录号: NM_001142836.1) 的 3'UTR 靶点区域, 设计引物(表 1)用于扩增包含 miRNA 靶位点的 3'UTR 区。以 PK15 细胞 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增产物纯化后和 psiCHECK-2 载体分别用 *Xho* I 和 *Not* I 于 37°C 双酶切 30min, 然后用 T4 DNA 连接酶于 16°C 过夜, 再将连接产物转化入感受态细胞 DH5 α 中。培养并挑取阳性克隆, 送尚亚生物技术(杭州)有限公司测序。鉴定结果正确的阳性克隆, 提取质粒, 进行酶切验证。

1.2.4 细胞培养与转染 将 BHK-21 细胞铺板至 24 孔板, 细胞融合至 80% 左右, 利用 LipofectamineTM 3000 进行转染, 按照说明书操作, 将阴性对照(NC)、miR-142-5p mimics、miR-145-5p mimics、miR-150 mimics、miR-199a-5p mimics 和双荧光报告载体共转染 BHK-21 细胞, 转染 24 h 后收集细胞, 用于检测细胞荧光素酶活性。

将 PK15 细胞铺板至 6 孔板和 12 孔板, 细胞融合至 50% 左右进行转染, 将只加转染试剂空白对照(MOCK)、阴性对照(NC)、miR-142-5p mimics、miR-145-5p mimics、miR-199a-5p mimics 转染 PK15 细胞, 共形成 5 个组合。转染 48h 后收集细胞, 6 孔板细胞用于检测 ATF6 的蛋白水平, 12 孔板用于检测内质网应激通路关键基因 *ATF6*、*PERK*、*IRE1* 和 *XBPI* 的 mRNA 表达水平。

表 1 双荧光素酶报告基因载体构建引物序列

Table 1 Primers sequences for luciferase reporter gene vector construct

名称 Names	引物序列 Primer sequence (5'—3')	片段长度 Size (bp)
ATF6-m142-3'UTR	F:CCGCTCGAGCCGTGGAGTGATTATGTG R:ATTGCGGCCGCCTTCTGAAACTTTACCCT	413
ATF6-m145-3'UTR	F:CCGCTCGAGCCTGGCTTGAATCTTCCC R:ATTGCGGCCGCGTTGTGAGTTCGATCCCT	301
ATF6-m150-3'UTR	F:CCGCTCGAGTTTTGTCAGTCTGGGTC R:ATTGCGGCCGAAGATACCTTTGTCATTC	464
ATF6-m199a-3'UTR	F:CCGCTCGAGTCTTTCTGCCTTCTTGGT R:ATTGCGGCCGCGGAAGATGTAGGGTAATGTG	176
PERK-m145/150-3'UTR	F:CCGCTCGAGCATGGAATAGCCACCTC R:ATTGCGGCCGCTTGGGAAAGTACCGACCT	777
IRE1-m142/145/199-3'UTR	F:CCGCTCGAGATCGAACCCGAGCCACTG R:ATTGCGGCCGAGACGCCATCATCAATCA	1006
IRE1-m150-3'UTR	F:CCGCTCGAGAGCCAAGTGCCTTGAGCTG R:ATTGCGGCCGCACAGGCTGACATCAAACAGGA	256
GRP78-m145/199-3'UTR	F:CCGCTCGAGACTGCTCTGCTAGTGTG R:ATTGCGGCCGCACCAGTGAAATAACAAA	349
XBPI-m142/145/150/199-3'UTR	F:CCGCTCGAGCTGCTTTCAACCAGCCACT R:ATTGCGGCCGCCCTCAGGTAGGCATTCT	596

标下划线的序列为 *Xho* I 和 *Not* I 酶切位点 The underlined sequences are *Xho* I and *Not* I digestion sites

1.2.5 双荧光素酶活性检测 按照 Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System 说明书操作。PBS 清洗细胞后, 每孔加 100 μ L 1 \times Passive Lysis Buffer, 放置室温摇床缓慢摇动 15 min。吸取 5 μ L 裂解液至 96 孔黑色酶标板对应孔中, 再加入 25 μ L LAR-II 试剂, 使用多功能酶标仪测定萤火虫荧光素酶的荧光值。然后每孔加入 25 μ L 1 \times Stop &Glo 终止液, 检测海肾荧光素酶的荧光值。最后以萤火虫荧光作为内参照对结果进行均一化处理。

1.2.6 总 RNA 提取及 cDNA 合成 利用 Trizol 法提取 PK15 细胞总 RNA, 使用分光光度计和 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的浓度和完整性。以 PK15 细胞总 RNA 作为模板进行 cDNA 的合成, 反应体系 20 μ L: 5 \times EasyQuick RT MasterMix 4 μ L, RNA1 μ g, RNase-free ddH₂O 补足体系, 涡旋震荡混匀, 经短暂离心, PCR 反应条件: 37 $^{\circ}$ C 15 min; 85 $^{\circ}$ C 5 s, 反应结束后 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.7 荧光定量引物设计合成与 qRT-PCR 反应 根

据 NCBI 已发表的猪 *ATF6*、*IRE1*、*PERK*、*XBPI*、*GAPDH* 序列设计 qRT-PCR 引物 (表 2)。以不同处理组的 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 扩增。扩增结束后分析溶解曲线, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *ATF6*、*IRE1*、*PERK*、*XBPI* 的相对表达量。

1.2.8 Western blot 检测 利用 RIPA 细胞裂解液提取转染后 PK15 细胞的总蛋白, BCA 试剂盒检测蛋白浓度。每组蛋白上样量相同, 经 SDS-PAGE 电泳分离后, 转移到 PVDF 膜上。将膜置于 5%脱脂奶粉中, 室温封闭 2h。加 5%脱脂奶粉稀释 ATF6 抗体 (1:1000) 及 β -Actin 抗体 (1:5000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 1 \times TBST 充分洗膜 3 次 (10 min/次) 后, 分别加入 HRP 标记的二抗 (1:10000), 室温孵育 1 h, 最后扫描分析目的蛋白条带。

1.2.9 数据统计分析 试验数据均用平均值 \pm 标准误差表示, 每个试验 3 个生物学重复, 统计学分析采用 T 检验, * P <0.05; ** P <0.01, 具有统计学意义。

表 2 qRT-PCR 引物序列

Table 2 The sequences of qRT-PCR primers

名称 Names	引物序列 Primer sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temperature (°C)	片段长度 Size (bp)
ATF6	F:CTAAAGCGAGTCCTCTACG	60	241
	R:GCCATGCCTGATTCACA		
XBP1	F:GGATTCTGACGGTGTGA	60	161
	R:GGAGGCTGGTAAGGAACT		
PERK	F:AGGAGCAAACGGAGCACG	60	187
	R:GTCGGTGAGGATGAGGATGG		
IRE1	F:GGACTGGCGGGAGAACAT	60	272
	R:CGTGGTAGTAGGGCTGGAA		
GAPDH	F:GGACTCATGACCACGGTCCAT	60	220
	R:TCAGATCCACAACCGACACGT		

2 结果

2.1 PRV 感染 PK15 细胞后 miRNA 差异表达分析

由笔者所在课题组前期研究结果表明 PRV 感染能够激活内质网应激, 所以为了检测 PRV 感染引起 miRNA 表达的变化, 用 PRV 感染 PK15 细胞, 感染后 12 h 收集细胞提取 RNA 进行 miRNA 测序。结果表明, PRV 感染 PK15 细胞后, 诱导 miRNA 差异表达。与 PRV 未感染的空白对照组相比, PRV 感染后共引起 35 条 miRNAs 表达变化, 其中包括 27 条 miRNAs (miR-132、miR-136-3p、miR-142-3p、miR-142-5p、miR-146b、miR-190b、miR-199a-3p、miR-199a-5p、miR-199b-3p、miR-199b-5p、miR-212、miR-218、miR-218-5p、miR-218b、miR-323、miR-363、miR-369、miR-375、miR-381-3p、miR-382、miR-551a、miR-758、miR-874、miR-9、miR-9-1、miR-9-2、miR-9820-5p) 表达量上调, 8 条 miRNAs (miR-10391、miR-2366、miR-27b-5p、miR-30c-1-3p、miR-30c-3p、miR-374b-3p、miR-671-3p、miR-885-3p) 表达量下调 (图 1)。结果表明, PRV 感染引起猪内质网应激后, 宿主细胞 miRNA 表达发生变化。

2.2 靶向内质网通路关键基因的 miRNAs 预测

利用 TargetScan 生物信息学软件, 预测出与 *ATF6*、*IRE1*、*PERK*、*GRP78*、*XBP1* 具有靶标关系的 miRNAs 分别有 55、14、52、30 和 21 个。用韦恩图取交集, miR-150 同时靶向 *ATF6*、*IRE1*、*PERK*、*GRP78*、*XBP1* 五个基因, miR-142-5p 同时靶向 *ATF6*、*PERK*、*IRE1*、*GRP78* 基因, miR-145-5p 和 miR-199a-5p 同时靶向 *ATF6*、*IRE1*、*GRP78*、*XBP1* 基因 (图 2)。

于是, 本研究选择 miR-142-5p、miR-145-5p、miR-150 和 miR-199a-5p 作为候选 miRNAs。

2.3 双荧光素酶报告基因载体的构建与鉴定

将 *ATF6*、*IRE1*、*PERK*、*GRP78*、*XBP1* 的 3'UTR 区插入 psiCHECK-2 构建双荧光报告载体, 再将连接产物转化入大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 中, 培养并挑取单克隆, 送去公司测序。鉴定结果正确的阳性克隆, 提取质粒, 进行酶切验证 (图 3)。最终获得重组正确的双荧光报告载体分别命名为 psiCHECK-2-ATF6-m142-3'UTR、psiCHECK-2-ATF6-m145-3'UTR、psiCHECK-2-ATF6-m150-3'UTR、psiCHECK-2-ATF6-m199-3'UTR、psiCHECK-2-IRE1-m150-3'UTR、psiCHECK-2-IRE1-m142/145/199-3'UTR、psiCHECK-2-PERK-m145/150-3'UTR、psiCHECK-2-XBP1-m142/145/150/199-3'UTR、psiCHECK-2-GRP78-m145/199-3'UTR。

2.4 荧光素酶报告基因活性检测

为了进一步确认 miR-142-5p、miR-145-5p、miR-150 和 miR-199a-5p 能够靶向作用于内质网通路关键基因, 将重组质粒分别与 miR-142-5p mimics、miR-145-5p mimics、miR-150 mimics 和 miR-199a-5p mimics 共转染, 24 h 后检测荧光素酶活性。结果显示, 共转染 psiCHECK-2-ATF6-m142-3'UTR 与 miR-142-5p mimics 后, 过表达组的荧光素酶活性极显著低于阴性对照组 (图 4-A)。同时, psiCHECK-2-IRE1-m142/145/199-3'UTR 分别与 miR-142-5p mimics、miR-145-5p mimics、miR-199a-5p mimics 共转染, 过表达组的荧光素酶活性极显著低于阴性对照组 (图 4-B), 以及 psiCHECK-2-XBP1-m142/145/150/199-3'UTR 分别与 miR-142-5p mimics、miR-199a-5p mimics 共转染, 过

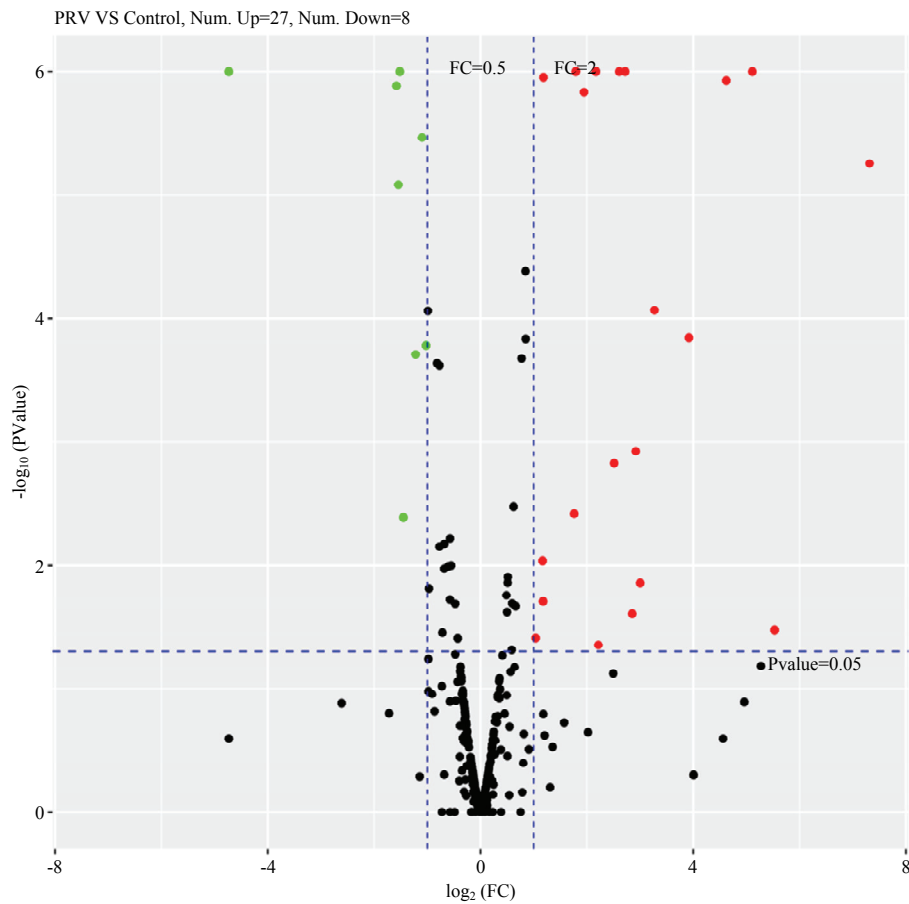


图 1 PRV 感染 PK15 细胞 miRNA 测序数据火山图

Fig. 1 Volcano plot of miRNA-seq data from PRV infected PK15 cells

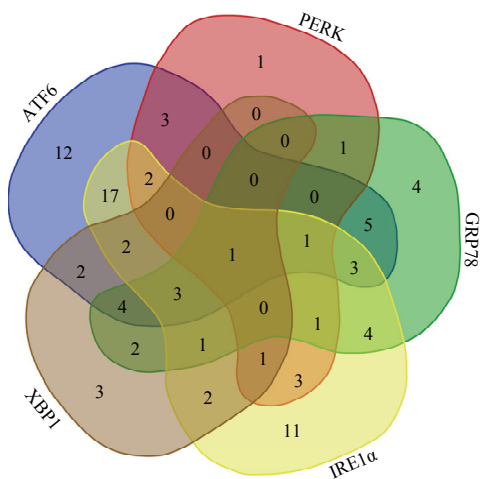
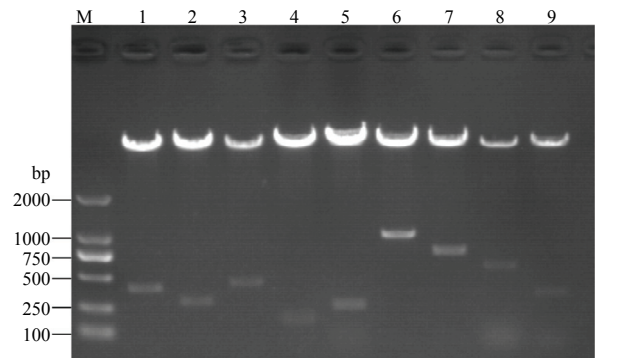


图 2 与 *ATF6*、*IRE1*、*PERK*、*GRP78*、*XBP1* 具有靶标关系的 miRNAs 交集预测

Fig. 2 The intersection prediction of miRNAs target *ATF6*, *IRE1*, *PERK*, *GRP78* and *XBP1*



M: DL2000 Marker; 1: psiCHECK-2-ATF6-m142-3'UTR, 2: psiCHECK-2-ATF6-m145-3'UTR, 3: psiCHECK-2-ATF6-m150-3'UTR, 4: psiCHECK-2-ATF6-m199-3'UTR, 5: psiCHECK-2-IRE1-m150-3'UTR, 6: psiCHECK-2-IRE1-m142/145/199-3'UTR, 7: psiCHECK-2-PERK-m145/150-3'UTR, 8: psiCHECK-2-XBP1-m142/145/150/199-3'UTR, 9: psiCHECK-2-GRP78-m145/199-3'UTR

图 3 双荧光报告基因载体双酶切鉴定

Fig. 3 Identification of luciferase reporter gene vector by *Xho* I and *Not* I double digestion

表达组的荧光素酶活性也极显著低于阴性对照组（图 4-C）。共转染 psiCHECK-2-PERK-m145/150-3'UTR 与 miR-145-5p mimics，能够显著下调荧光素酶报告基因的表达（图 4-D）。结果表明，miR-142-5p 与 *ATF6*、

IRE1、*XBPI* 的 3'UTR 靶位点结合，miR-199a-5p 与 *IRE1*、*XBPI* 的 3'UTR 靶位点结合，以及 miR-145-5p 与 *IRE1*、*PERK* 的 3'UTR 靶位点结合，从而抑制了荧光信号的产生。

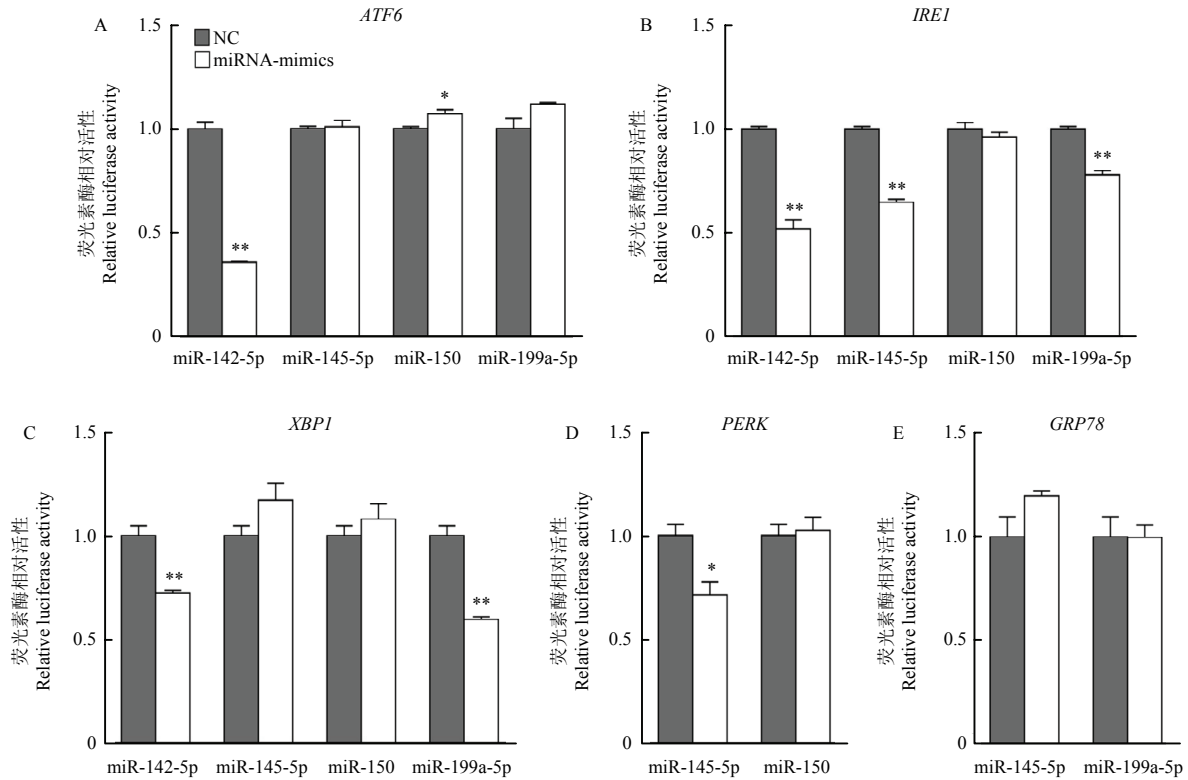


图 4 miR-142-5p mimics、miR-145-5p mimics、miR-150 mimics 和 miR-199a-5p mimics 对重组载体荧光素酶表达的影响
Fig. 4 Influence of miR-142-5p mimics, miR-145-5p mimics, miR-150 mimics and miR-199a-5p mimics on luciferase expression of recombinant vector

2.5 qRT-PCR 分析

根据荧光素酶报告系统筛选结果，利用 qRT-PCR 试验来进一步验证。将空白对照 (MOCK)、阴性对照 (NC)、miR-142-5p mimics、miR-145-5p mimics、miR-199a-5p mimics 分别转染 PK15 细胞，转染 48 h 后收集细胞，qRT-PCR 检测 *ATF6*、*IRE1*、*XBPI* 和 *PERK* 的 mRNA 表达水平。结果表明，过表达 miR-142-5p 后，*ATF6* 的表达量显著低于阴性对照组和空白对照组 ($P < 0.05$ ，图 5-A)。说明 miR-142-5p 负调控 *ATF6* 的表达。而 miR-142-5p、miR-145-5p 和 miR-199a-5p 过表达后，极显著上调 *IRE1* mRNA 表达 ($P < 0.01$ ，图 5-B)。同样，过表达 miR-142-5p 和 miR-199a-5p 后，*XBPI* 的 mRNA 表达也显著上调 ($P < 0.05$ ，图 5-C)。

2.6 过表达 miR-142-5p 对 ATF6 蛋白表达的影响

过表达 miR-142-5p 后，ATF6 蛋白的表达情况见图 6。结果显示，过表达组中 ATF6 的表达量显著低于阴性对照组和空白对照组。结果表明，miR-142-5p 与 ATF6 靶位点结合后，抑制 ATF6 蛋白的表达。

3 讨论

3.1 miRNA 测序分析

miRNA 是一类 18—25 bp 的调节性非编码 RNA，主要通过部分碱基互补配对方式将其种子序列与靶基因 mRNA 的 3'UTR 结合，从而调控基因表达参与多种重要生理过程。大量研究表明，miRNA 在调控内质网应激通路关键基因中发挥重要作用^[18-22]，但是大部分报道都集中在人和小鼠等哺乳动物的研究

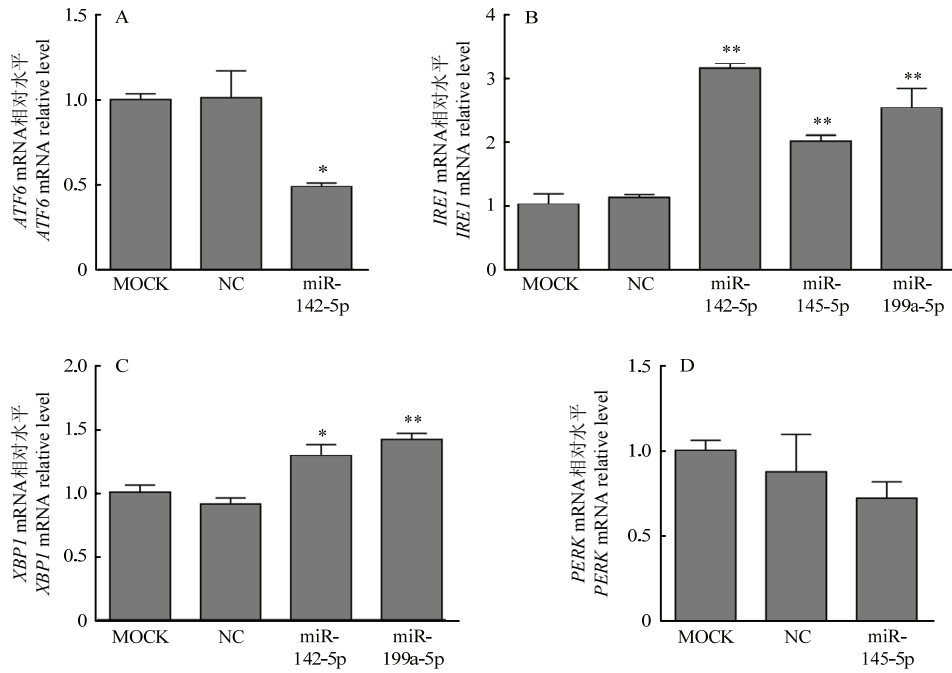


图 5 过表达 miRNAs 后 ATF6、IRE1、XBP1 和 PERK mRNA 的表达量

Fig. 5 The expression of ATF6, IRE1, PERK and XBP1 mRNA after over-expression miRNAs

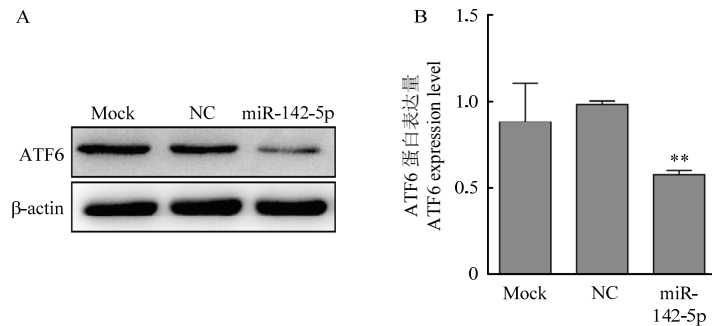


图 6 转染 miR-142-5p mimics 后 PK15 细胞中 ATF6 蛋白表达检测

Fig. 6 Western blotting analysis of ATF6 in PK15 cells transfected with miR-142-5p mimics

上,对猪 miRNA 的研究尚未报道。因此,开展内质网应激通路相关 miRNA 的研究,为从转录后水平调控内质网应激通路从而调控 PRV 感染奠定理论基础。

本课题组前期研究结果显示 PRV 感染激活内质网应激通路。本研究首先利用高通量测序方法发现 PRV 感染 PK15 细胞后引起 35 条 miRNAs 差异表达,

其中包括 miR-132、miR-142-5p、miR-199a-5p、miR-374b-3p、miR-382 和 miR-874。研究表明 PRV 感染后引起 miR-132、miR-199a/b-3p 和 miR-374b-3p 等 13 条 miRNAs 在宿主细胞内差异表达,同时通过 GO 富集分析差异表达 miRNAs 潜在的宿主靶基因,发现这些靶基因参与生物调节、应激反应、免疫应答和细胞凋亡等信号传导过程^[23]。还有研究发现,CSFV 感

染 PK15 细胞后引起 miR-382 和 miR-874 等 69 条 miRNAs 表达变化^[24]。推测 PRV 感染引起猪内质网应激后, 宿主 miRNA 靶向内质网应激通路关键基因, 从而参与调控内质网应激过程。

3.2 生物信息学软件预测分析

本研究中, 利用生物信息学的方法预测与内质网应激通路关键基因 *ATF6*、*IRE1*、*PERK*、*GRP78*、*XBPI* 具有靶标关系的 miRNAs, 发现与 *ATF6*、*IRE1*、*PERK*、*GRP78*、*XBPI* 中至少 4 个基因具有靶标关系的 miRNAs, 分别是 miR-142-5p、miR-145-5p、miR-150、miR-199a-5p。其中 miR-142-5p 和 miR-199a-5p 在 miRNA 测序结果中也显示为差异表达。研究发现 ERS 传导器 IRE1 通过下调 miR-150 介导纤维化, 同时 IRE1 促进 XBPI 剪接进而激活肌成纤维细胞中内质网扩张^[25]。此外, 面对各种环境应激, miRNA 成为应激后免疫修饰的靶点。miR-142-5p、miR-150 在热应激大鼠中差异表达, 调控参与大鼠小肠热应激病理及生理反应相关的基因表达^[26]。HPV 感染细胞后下调 miR-145 表达, 低表达的 miR-145 使细胞免受环境应激诱导的凋亡^[27]。有研究表明, 在人肺腺癌细胞中, miR-199a-5p 通过调控 *GRP78* 转录本使 *GRP78* 基因表达水平显著下调^[28]。因此推测, miR-142、miR-145、miR-150、miR-199 可能在猪内质网应激过程中发挥着调控作用。

3.3 候选 miRNAs 对内质网关键基因表达的影响

根据 miRNA 预测结果, 构建了双荧光素酶报告基因重组载体, 并利用双荧光素酶报告系统验证发现 miR-142-5p mimics 显著抑制 psiCHECK-2-ATF6-m142-3'UTR 重组载体荧光素酶活性。同时 qRT-PCR 和 Western blot 试验再次验证了这一结果, 过表达 miR-142-5p 后, *ATF6* 的 mRNA 水平和蛋白表达均显著下调。表明 miR-142-5p 通过降解 mRNA 的方式靶向猪 *ATF6*。针对靶向人 *ATF6* 的 miRNA 研究结果发现, 在 UPR 过程中, PERK 介导的 miR-424 与 *ATF6* 的 3'UTR 区作用位点结合调节 *ATF6* 的表达, 并减弱 *ATF6* 转录活性^[29], miR-145、miR-221 和 miR-494 可以靶向 *ATF6* 的 3'UTR 区进而抑制囊性纤维化中 *ATF6* 表达^[19]。而本研究中发现 miR-145-5p 并不靶向猪 *ATF6*, 具体机制尚需要进一步研究。

本研究中, miR-142-5p、miR-199a-5p 均与 *IRE1*、*XBPI* 的 3'UTR 靶位点结合, 从而抑制了荧光素酶活性。但 qRT-PCR 结果显示, *IRE1* 和 *XBPI* 的 mRNA

表达水平并未下调, 而且显著上调, 可能是由于 miR-142-5p 和 miR-199a-5p 同时激活相关信号通路从而上调 *IRE1* 和 *XBPI* 表达, 如 miR-142-5p 同时能够激活 UPR 的 ATF6 信号传导通路, ATF6 可以协同 IRE1 信号传导通路, 促进 *XBPI* 的 mRNA 转录^[30]。研究表明, miR-30d、miR-181a 和 miR-199a-5p 三条 miRNAs 共转录能够明显降低 *GRP78* 表达, 三条 miRNAs 的联合作用可能是实现 *GRP78* 显著下调的关键^[18]。本研究中双荧光素酶报告系统结果显示, 单独 miR-199a-5p 并不靶向猪 *GRP78* 3'UTR。据此推测可能需要多个 miRNAs 才能有效调控 *GRP78* 的表达。

以上结果表明, miR-142-5p 可能靶向 *ATF6* 达到调控内质网应激反应的作用。

4 结论

本研究通过 miRNA 测序发现, 伪狂犬病毒感染诱导 miR-142-5p 表达上调, 同时, miR-142-5p 通过降解 mRNA 的方式靶向猪 *ATF6*, 因此推测 miR-142-5p 通过靶向 *ATF6* 调控伪狂犬病毒增殖。

References

- [1] FAGONE P, JACKOWSKI S. Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. *Journal of Lipid Research*, 2009, 50 Suppl(50 Suppl):S311. DOI: 10.1194/jlr.R800049-JLR200.
- [2] BRAAKMAN I, HEBERT D N. Protein folding in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2013, 5(5):a013201-a013201. DOI: 10.1101/cshperspect.a013201.
- [3] WANG M, KAUFMAN R J. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature*, 2016, 529(7586): 326-335. DOI: 10.1038/nature17041.
- [4] BOHNERT K R, MCMILLAN J D, KUMAR A. Emerging roles of ER stress and unfolded protein response pathways in skeletal muscle health and disease. *Journal of Cellular Physiology*, 2017. DOI: 10.1002/jcp.25852.
- [5] HETZ C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2012, 13:H2410-H2418. DOI: 10.1038/nrm3270.
- [6] WALTER P, RON D. The unfolded protein response: From stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 2011, 334(6059): 1081-1086. DOI: 10.1126/science.1209038.
- [7] BERTOLOTTI A, ZHANG Y H, HENDERSHOT L M, HARDING H P, RON D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in

- the unfolded-protein respons. *Nature Cell Biology*, 2000, 2(6):326-332. DOI: 10.1038/35014014.
- [8] HETZ C, PAPA F R. The unfolded protein response and cell fate control. *Molecular Cell*, 2017, 69(2). DOI: 10.1016/j.molcel.2017.06.017.
- [9] LEE A H, IWAKOSHI N N, GLIMCHER L H. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Molecular and Cellular Biology*, 2003, 23(21):7448-7459. DOI: 10.1128/MCB.23.21.7448-7459.2003.
- [10] 王镜淇, 龚国清. 内质网应激与炎症反应的研究进展. *药学研究*, 2017, 36(5):279-282. DOI: 10.13506/j.cnki.jpr.2017.05.009.
- WANG J Q, GONG G Q. Research progress on endoplasmic reticulum stress and inflammatory response. *Journal of Pharmaceutical Research*, 2017, 36(5): 279-282. DOI:10.13506/j.cnki.jpr.2017.05.009. (in Chinese)
- [11] DING W X, NI H M, GAO W T, HOU Y F, MELAN M A, CHEN X 划 Y, STOLZ D B, SHAO Z M, YIN X M. Differential effects of endoplasmic reticulum stress-induced autophagy on cell survival. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(7):4702-4710. DOI: 10.1074/jbc.m609267200.
- [12] HERBERT T P, LAYBUTT D R. A reevaluation of the role of the unfolded protein response in islet dysfunction: maladaptation or a failure to Adapt? *Diabetes*, 2016, 65(6):1472-1480. DOI: 10.2337/db15-1633.
- [13] 徐静尊, 鲁敏. 内质网应激与自噬及其交互作用影响内皮细胞凋亡. *中国生物化学与分子生物学报*, 2019, 35(3). DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2019.03.02.
- XU J Z, LU M. Effects of endoplasmic reticulum stress and autophagy on endothelial cell apoptosis. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2019, 35(3). DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2019.03.02.(in Chinese)
- [14] ZHOU Y S, GU Y X, QI B Z, ZHANG Y K, LI X L, FANG W H. Porcine circovirus type 2 capsid protein induces unfolded protein response with subsequent activation of apoptosis. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 2017, 18(4):316-323. DOI: 10.1631/jzus.B1600208.
- [15] HE W C, XU H L, GOU H C, YUAN J, LIAO J D, CHEN Y M, FAN S Q, XIE B M, DENG S F, ZHANG Y Y, CHEN J D, ZHAO M Q. CSFV Infection up-regulates the unfolded protein response to promote its replication. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2129. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02129.
- [16] YANG S B, PEI Y, ZHAO A Y. iTRAQ-based proteomic analysis of porcine kidney Epithelial PK15 cells infected with Pseudorabies virus. *Scientific Reports*, 2017, 7:45922. DOI: 10.1038/srep45922.
- [17] YANG S B, ZHU J J, ZHOU X L, WANG H, LI X C, ZHAO A Y. Induction of the unfolded protein response (UPR) during pseudorabies virus infection. *Veterinary Microbiology*, 2019, 239. DOI: 10.1016/j.vetmic.2019.108485.
- [18] SU S F, CHANG Y W, ANDREU-VIEYRA C, FANG J Y, YANG Z, HAN B, LEE A S, LIANG G. miR-30d, miR-181a and miR-199a-5p cooperatively suppress the endoplasmic reticulum chaperone and signaling regulator GRP78 in cancer. *Oncogene*, 2013, 32(39): 4694-4701. DOI: 10.1038/onc.2012.483.
- [19] OGLESBY I K, AGRAWAL R, MALL M A, MCELVANEY N G, GREENE C M. miRNA-221 is elevated in cystic fibrosis airway epithelial cells and regulates expression of ATF6. *Molecular and Cellular Pediatrics*, 2015, 2(1):1. DOI: 10.1186/s40348-014-0012-0.
- [20] ZHANG W G, CHEN L, DONG Q, HE J, ZHAO H D, LI F L, LI H. Mmu-miR-702 functions as an anti-apoptotic mirtron by mediating ATF6 inhibition in mice. *Gene*, 2013, 531(2):235-242. DOI: 10.1016/j.gene.2013.09.005.
- [21] YANG F, ZHANG L, WANG F, WANG Y, HUO X S, YIN Y X, WANG Y Q, ZHANG L, SUN S H. Modulation of the unfolded protein response is the core of microrna-122-involved sensitivity to chemotherapy in hepatocellular carcinoma. *Neoplasia*, 2011, 13(7): 590. DOI: 10.1593/neo.11422.
- [22] BYRD A E, ARAGON I V, BREWER J W. MicroRNA-30c-2* limits expression of proadaptive factor XBP1 in the unfolded protein response. *Journal of Cell Biology*, 2012, 196(6):689-698. DOI: 10.1083/jcb.201201077.
- [23] LIU F, ZHENG H, TONG W, LI G X, TIAN Q, LIANG C, LI L W, ZHENG X C, TONG G Z. Identification and analysis of novel viral and host dysregulated micrnas in variant pseudorabies virus-infected PK15 cells. *PLoS ONE*, 2016, 11(3):e0151546. DOI: 10.1371/journal.pone.0151546.
- [24] 邓少锋, 叶佐东, 范双旗, 陈金顶, 张静远, 朱梦娇, 赵明秋. PK-15 细胞中与 CSFV 感染相关的 microRNAs 筛选及 miR-214 的功能研究. *中国农业科学*, 2018, 51(21):156-167. DOI: 10.3864/j.issn.0578-1752.2018.21.014.
- DENG S F, YE Z D, FAN S Q, CHEN J D, ZHANG J Y, ZHU M J, ZHAO M Q. Screen of micrnas in classical swine fever virus-infected pk-15 cells and the regulation of virus replication by

- miR-214. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51(21):156-167. DOI: 10.3864/j.issn.0578-1752.2018.21.014.(in Chinese)
- [25] HEINDRYCKX F, BINET F, PONTICOS M, ROMBOUTS K, LAU J, KREUGER J, GERWINS P. Endoplasmic reticulum stress enhances fibrosis through IRE1 α -mediated degradation of miR-150 and XBP-1 splicing. *EMBO Molecular Medicine*, 2016, 8. DOI: 10.15252/emmm.201505925.
- [26] YU J, LIU F H, YIN P, ZHU X Y, CHENG G L, WANG N, LU A, LUAN W L, ZHANG N W, LI J F, GUO K J, YIN Y L, WANG H C, XU J Q. Integrating miRNA and mRNA expression profiles in response to heat stress-induced injury in rat small intestine. *Functional & Integrative Genomics*, 2011, 11(2):203-213. DOI: 10.1007/s10142-010-0198-8.
- [27] LIU X Y, ZHANG Y, WANG S, LIU G Y, RUAN L M. Loss of miR-143 and miR-145 in condyloma acuminatum promotes cellular proliferation and inhibits apoptosis by targeting NRAS. *Royal Society Open Science*, 2018. DOI: 10.1098/rsos.172376.
- [28] AHMADI A, KHANSARINEJAD B, HOSSEINKHANI S, GHANEI M, MOWLA S J. miR-199a-5p and miR-495 target GRP78 within UPR pathway of lung cancer. *Gene*, 2017, 620:15-22. DOI: 10.1016/j.gene.2017.03.032.
- [29] GUPTA A, HOSSAIN M M, READ D E, HETZ C, SAMALI A, GUPTA S. PERK regulated miR-424(322)-503 cluster fine-tunes activation of IRE1 and ATF6 during Unfolded Protein Response. *Scientific Reports*, 2016, 5(1):18304. DOI: 10.1038/srep18304.
- [30] ADACHI Y, YAMAMOTO K, OKADA T, YOSHIDA H, HARADA A, MORI K. ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell Structure and Function*, 2008, 33(1):75-89. DOI: 10.1247/csf.07044.

(责任编辑 林鉴非)

中国农业科学

主 编: 万建民

副 主 编: (以拼音字母为序)

陈焕春 陈温福 李云霞
孙 坦 王汉中 吴孔明
张改平 张洪程 邹瑞苍

《中国农业科学》编委会

顾 问 (以拼音字母为序)

程顺和 邓秀新 傅廷栋 官春云 李家洋 刘 旭 刘秀梵 路文如
吕飞杰 屈冬玉 向仲怀 许世卫 翟虎渠 张启发 朱英国

主任委员 唐华俊

副主任委员 赵方田 方智远 周清波 刘继芳

栏目主编 (以拼音字母为序)

陈化兰 黄三文 李少昆 罗绪刚 万方浩 王 强 张维理 张学勇

委 员 (以英文字母为序)

M. Alley, USA	David A. Andow, USA	R. Appels, Australia
Jill Shore Auburn, USA	Bing Yang, USA	Bas Bouman, IRRRI
Bouzayen M, France	John Bower, South Africa	Kenneth G. Cassman, USA
Chen Xian-ming, USA	Chen Z X, USA	Michael T. Clegg, USA
Matthew J. W. Cock, Switzerland	Nick Costa, Australia	Thomas Crenshaw, USA
Zhanao Deng, USA	C. Robert Dove, USA	Lester E. Ehler, USA (转封三)

编 辑 部

主 任 孙雷心

副 主 任 林鉴非

值 班 编 辑 赵 琪 王红艳

中国农业科学

(半月刊, 1960年创刊)

2020年8月1日 第53卷第15期

Scientia Agricultura Sinica

(Semimonthly, Started in 1960)

Vol.53 No.15 August 1, 2020

主 管 中华人民共和国农业农村部

主 办 中国农业科学院
中国农学会

编辑出版 《中国农业科学》编辑部

地 址 北京中关村南大街12号

邮政编码 100081

电 话 010-82109808 82106281

传 真 010-82106247

网 址 <http://www.ChinaAgriSci.com>

电子邮件 zgnykx@caas.cn

印刷装订 中国电影出版社印刷厂

国内发行 北京报刊发行局

订 购 处 全国各地邮电局

国外发行 中国国际图书贸易总公司
(北京399信箱)

国内定价 49.50元/期 1188.00元/年

Superintended by Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P. R. China

Sponsored by Chinese Academy of Agricultural Sciences
Chinese Association of Agricultural Science Societies

Published by Editorial Department of *Scientia Agricultura Sinica*

Address No.12 South Street, Zhongguancun, Beijing

Postcode 100081

Telephone 010-82109808 82106281

Fax 010-82106247

Website <http://www.ChinaAgriSci.com>

E-mail zgnykx@caas.cn

Issued by China Film Press Printing

Subscription Domestic Post Office

Issued Abroad by International Book Trading Corporation,
P.O.Box 399, Beijing, P.R. China

Abroad Issued No. BM43

Price US\$ 49.50 / Issue US\$ 1188.00 / year

ISSN 0578-1752 邮发代号: 2-138 国内外公开发行

CN 11-1328/S 国外代号: BM43 广告发布登记: 京海市监广登字 20170176号

ISSN 0578-1752



9 770578 175202

15>