



草鱼let-7b通过靶向slc4a4、wnk4和hbegf调控嗜水气单胞菌感染诱导的免疫应答

庞一帆，沈玉帮，徐晓雁*，李家乐*

- 1.上海海洋大学 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室，201306；
- 2.上海海洋大学 上海水产养殖工程技术研究中心，201306；
- 3.上海海洋大学 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心，201306

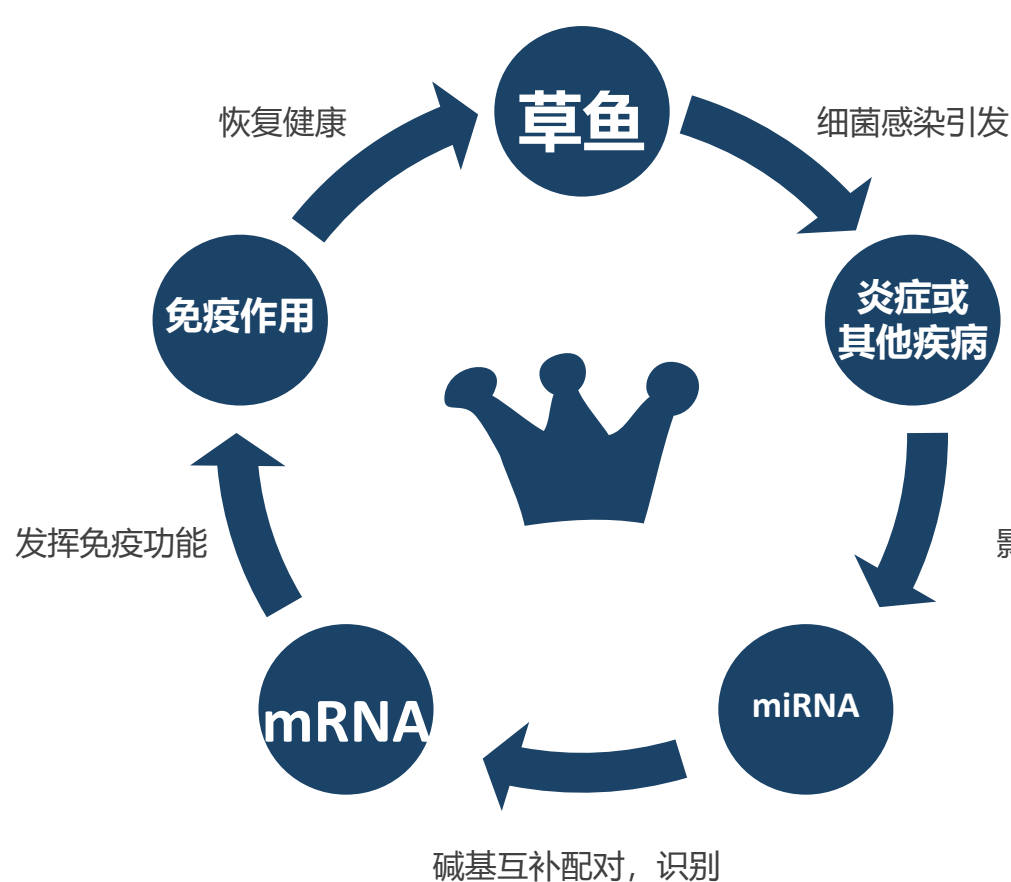
选题背景及意义



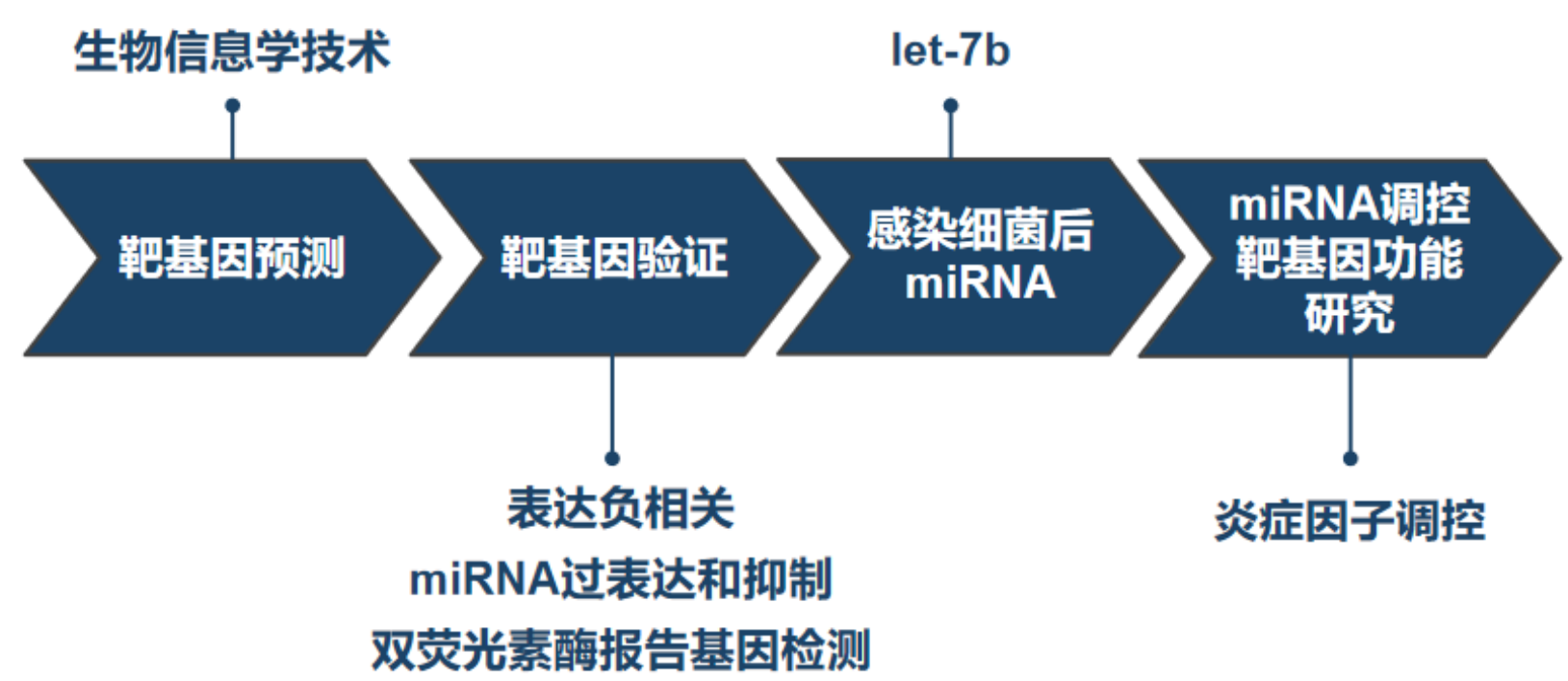
草食性鱼类，是我国重要的淡水养殖鱼。根据历年渔业年鉴的统计，多年来，我国草鱼总产量位居中国淡水鱼类养殖产量首位，在水产养殖产业中占有重要位置。

养殖密度的扩大
预防手段的缺乏
细菌感染的爆发

鱼类疾病泛滥
经济损失严重



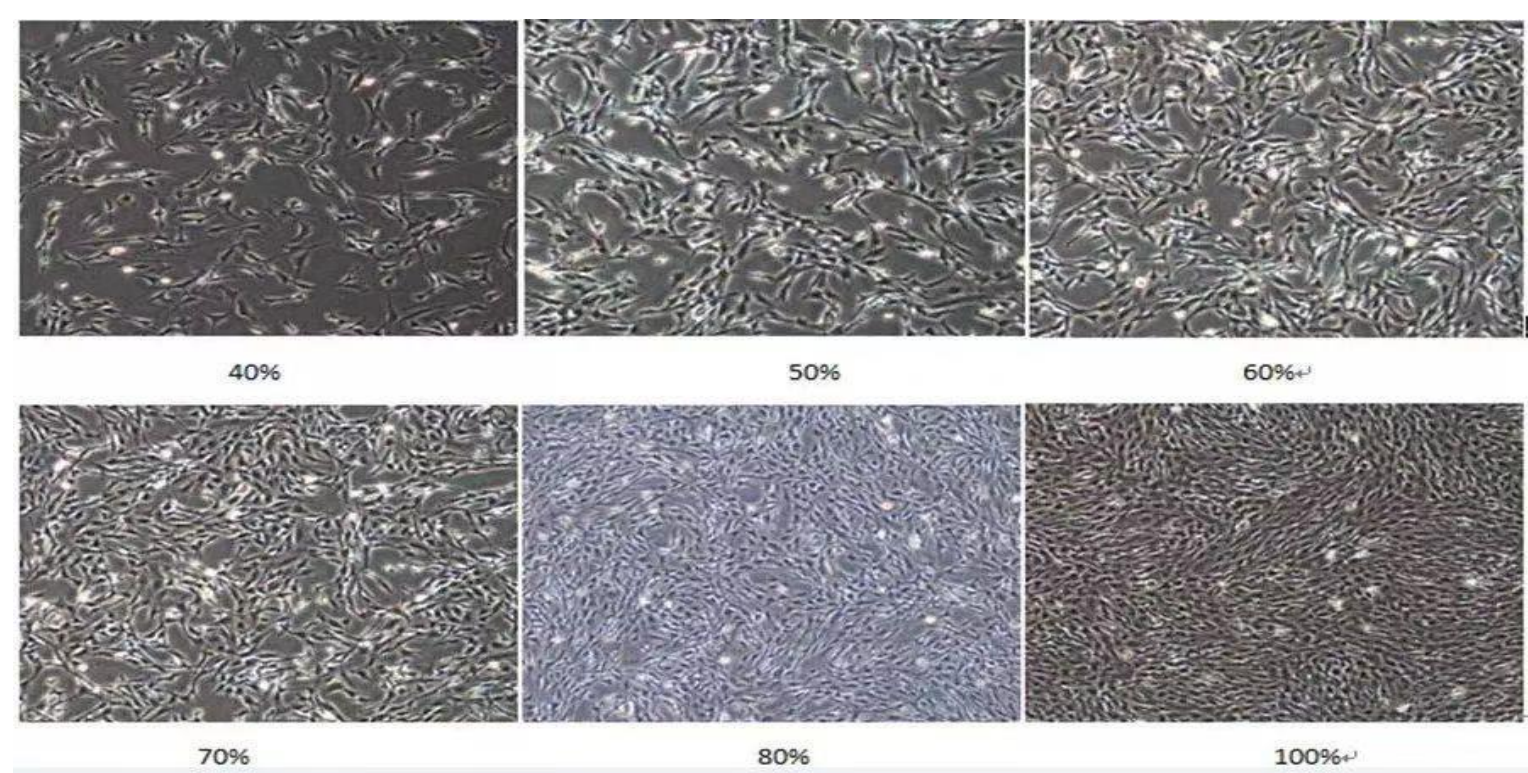
研究思路



材料与方法

1. 草鱼肾细胞的培养

草鱼肾脏细胞系(Ctenopharyngodon idella kideny, CIK) 购自中国典型培养物保藏中心。

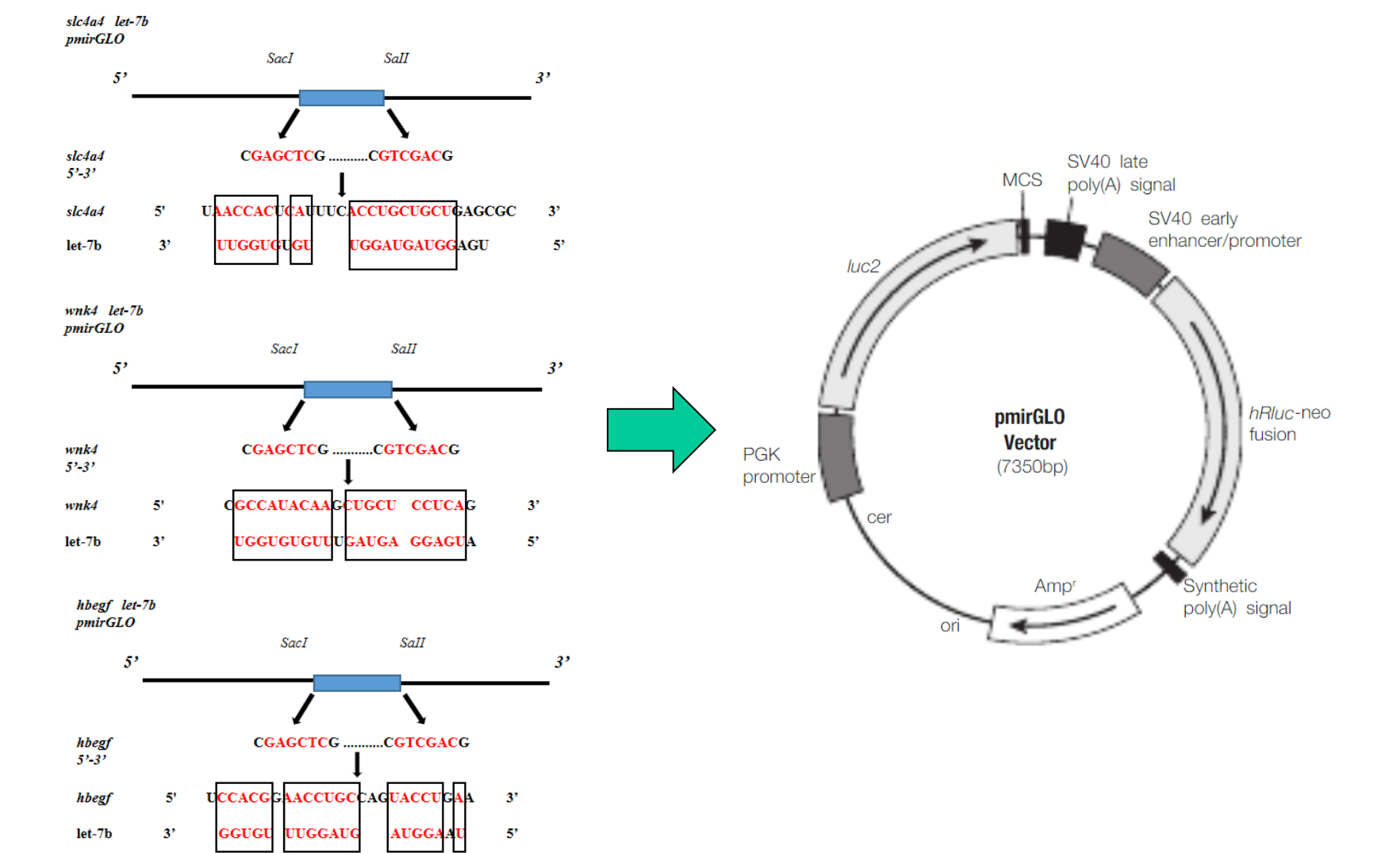


2. A. hydrophila感染草鱼肾细胞

实验用嗜水气单胞菌(AH10 菌株)由张国亮等[15]自草鱼体内分离，保存于武汉大学菌种保藏中心(保藏号: AB2014155)。



3. 靶位点预测和载体质粒构建



4. 荧光素酶报告基因实验

5. 细胞转染

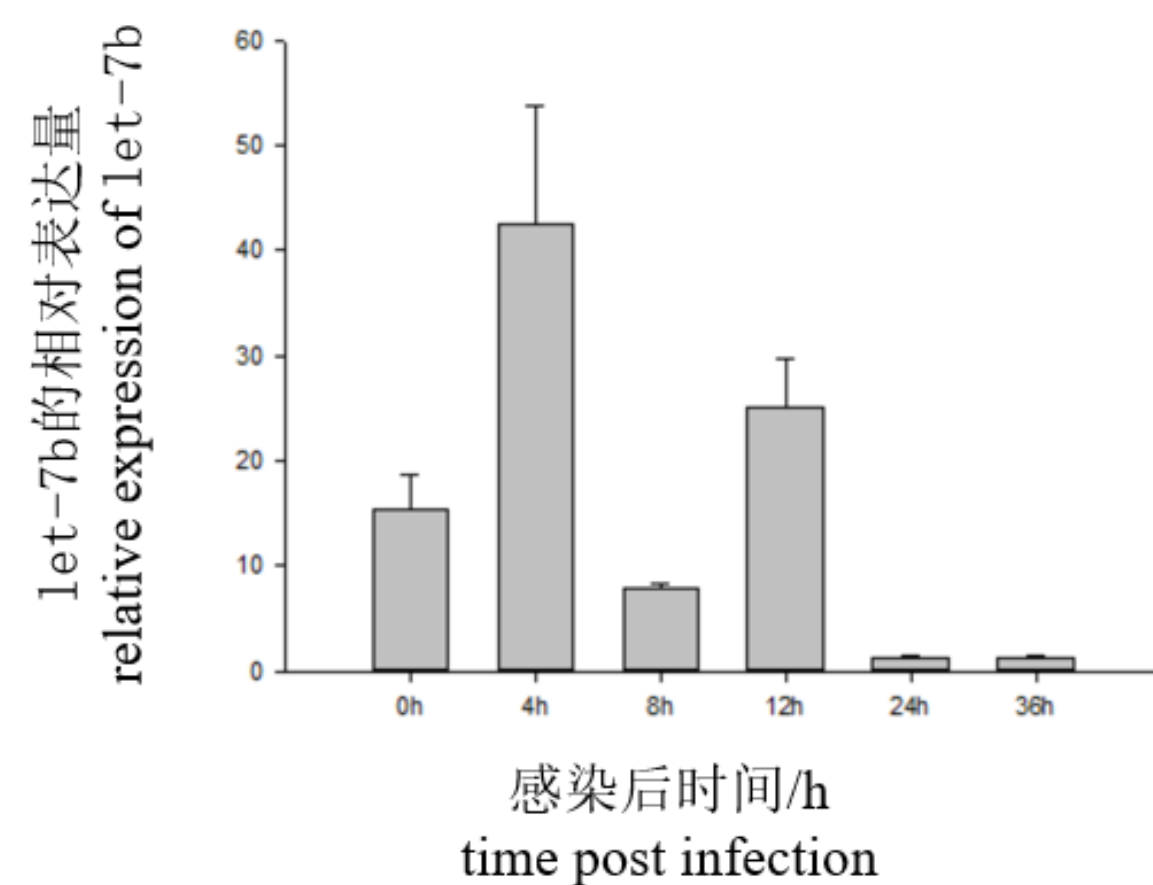
6. 实时定量 PCR

Primer	Forward primer(5'-3')	Reverse primer(5'-3')	Application
slc4a4-SacI/SalI	GAGCTCGACTGAGAACGCTTCGGAC	GTGACCTCTCCACTCCATCTCTGT	Vector construction
wnk4-SacI/SalI	GAGCTCACTGTATTAGTGCTCATCG	GTGACGCTCTGTACCATCTGTAA	Vector construction
hbegf-SacI/SalI	GAGCTCTGCGTCTTTTGTCTTACC	GTGACGCTATCACCATCTGCTCTTA	Vector construction
let-7b	TGAGGTAGTAGTGGTTGTGGTT	mRQ 3' primer	qPCR
slc4a4	GACTGAGAACGCTTCGGAC	CCTTCCACTCCATCTCTGT	qPCR
wnk4	ACCTGTATTGGCTCATCG	GCCTCTGTACCATCTGTAA	qPCR
hbegf	TGCTGTCTTTTGTCTTACC	TTTCTTCCACTGTCTGTT	qPCR
β-actin	TCATACCTCTAGCCCTCACTG	TCATGGTCTTTTGTGGCAAGGA	qPCR
IL-1β	TCTCTCTGCTGCTGGGTGT	CAAGACAGGTGAGGGGAAG	qPCR
IL-8 mRNA	GGACACGGAAAGGATTGACAG	CGGAGTCTGTTGGTATCG	qPCR
miR-101a	TACAGTACTGTGATACTGAAG	mRQ 3' primer	qPCR

所用引物序列

结果

1、嗜水气单胞菌感染对let-7b表达的影响

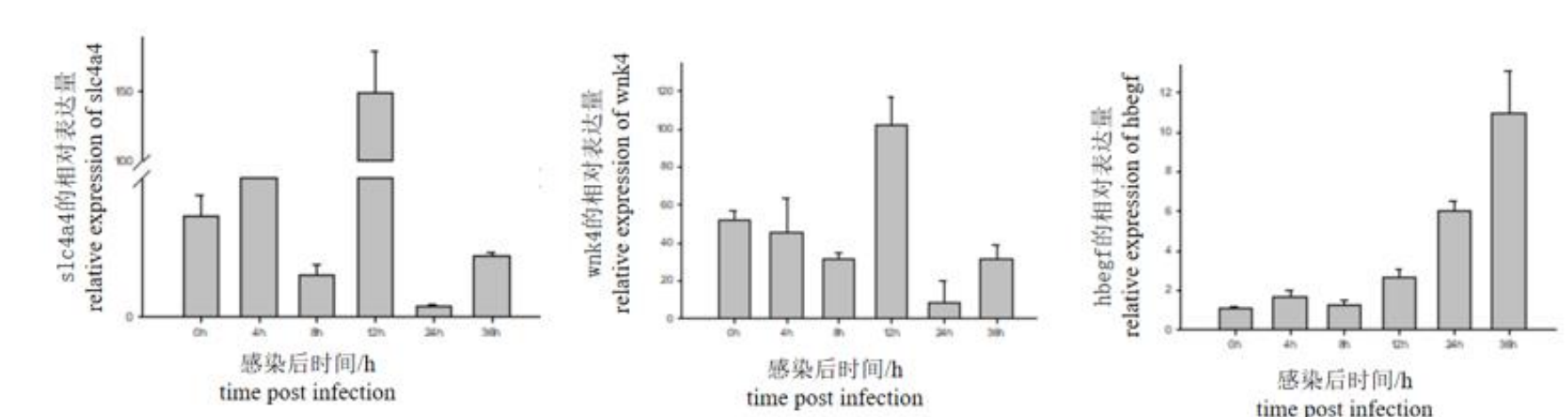


数据表明，let-7b的表达水平呈现先升高后降低再升高再降低的趋势，let-7b参与了A. hydrophila感染CIK细胞后的免疫应答。

2、let-7b 靶基因的鉴定

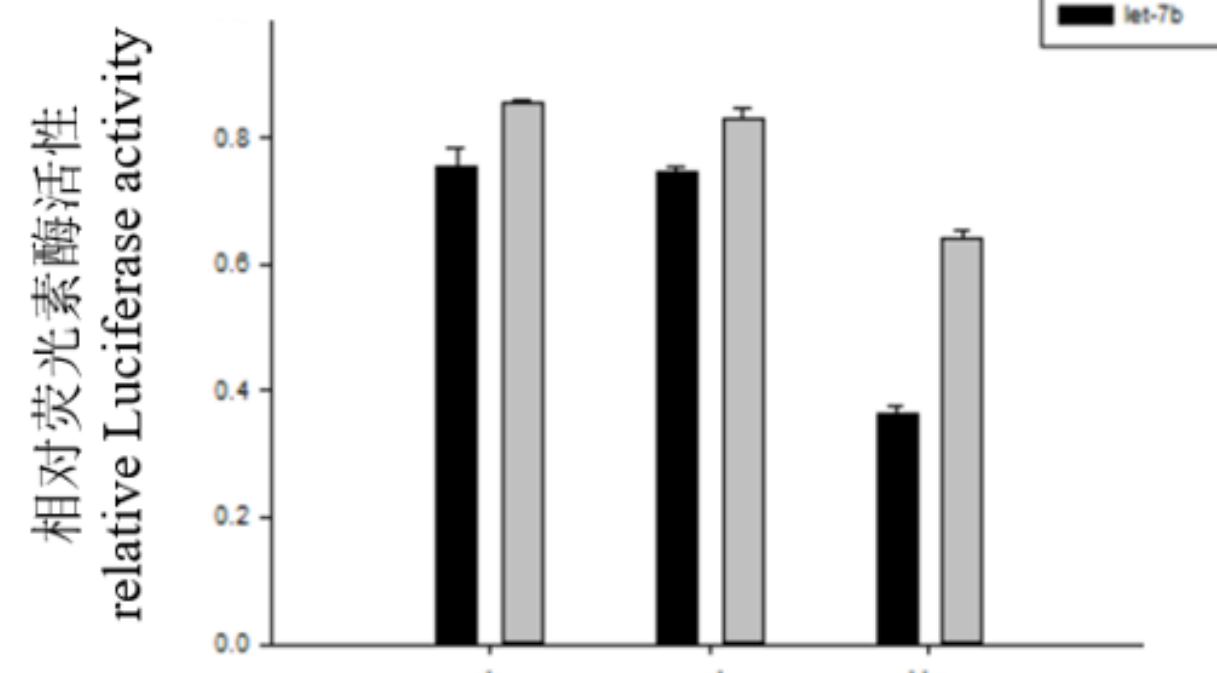
slc4a4	5'	A	U	UUUC	GAG	C	3'
		AACCAC	CA	ACCUGCUGCU	CG		
let-7b	3'	UUGGUG	GU	UGGAUGAUGG	GU	A	5'
		U					
wnk4	5'	C	G		G		3'
		GCCAUACAA	CUGCU	CCUCA			
let-7b	3'	UGGUGUGUU	GAUGA	GGAGU	A		5'
		U					
hbegf	5'	U	G	CAG	G	A	3'
		CCACG	AACCUGC	UACCU	A		
let-7b	3'	GGUGU	UUGGAUG	AUGGA	U	A	5'
		U					

基于课题组已有的miRNA-mRNA靶向关系，运用生物信息学软件RNAhybrid分析预测let-7b与slc4a4、wnk4和hbegf的潜在靶位点。



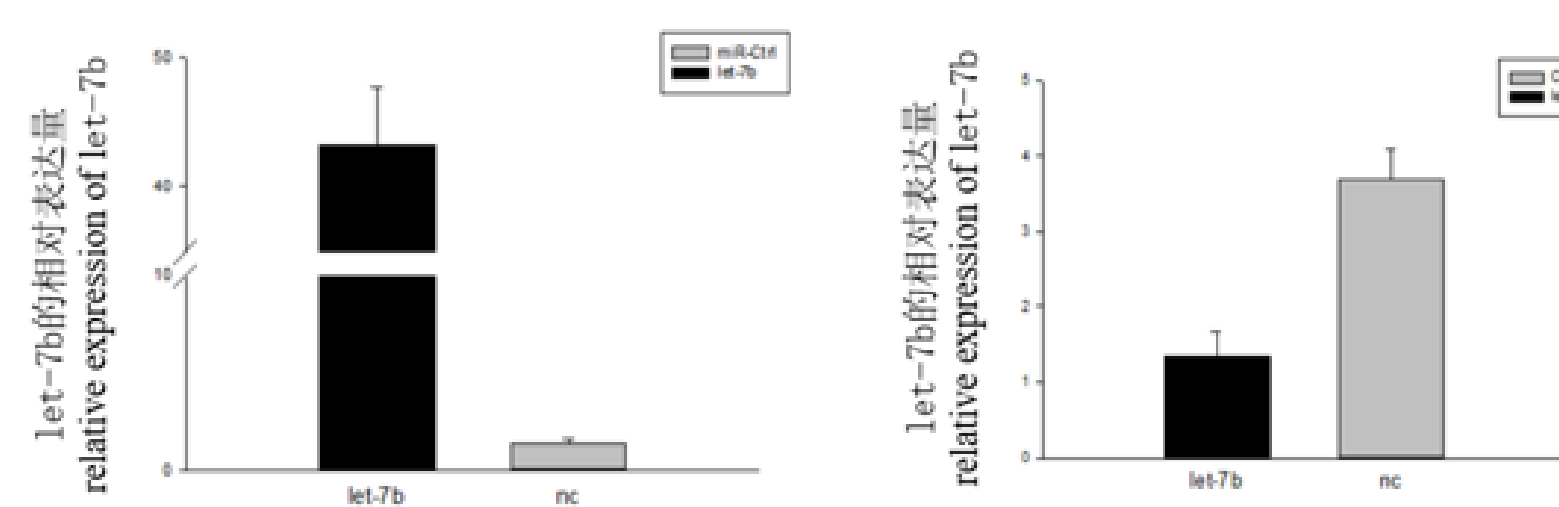
感染实验结果显示，slc4a4、wnk4和hbegf在嗜水气单胞菌感染过程中的表达水平与let-7b的表达模式在整体趋势上呈现负相关。

3、let-7b抑制CIK细胞中slc4a4、wnk4和hbegf的表达

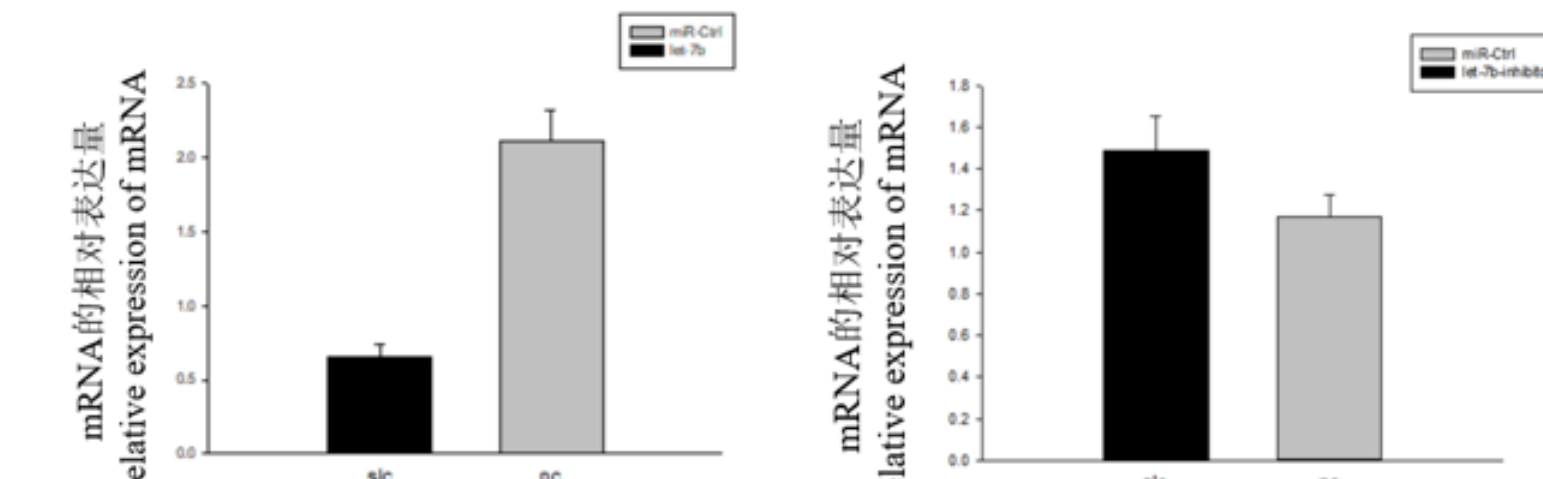


转染let-7b mimics抑制了slc4a4、wnk4和hbegf的荧光素酶活性，说明let-7b能靶向作用于slc4a4、wnk4和hbegf的3' UTR结合位点并可有效抑制slc4a4、wnk4和hbegf的表达。

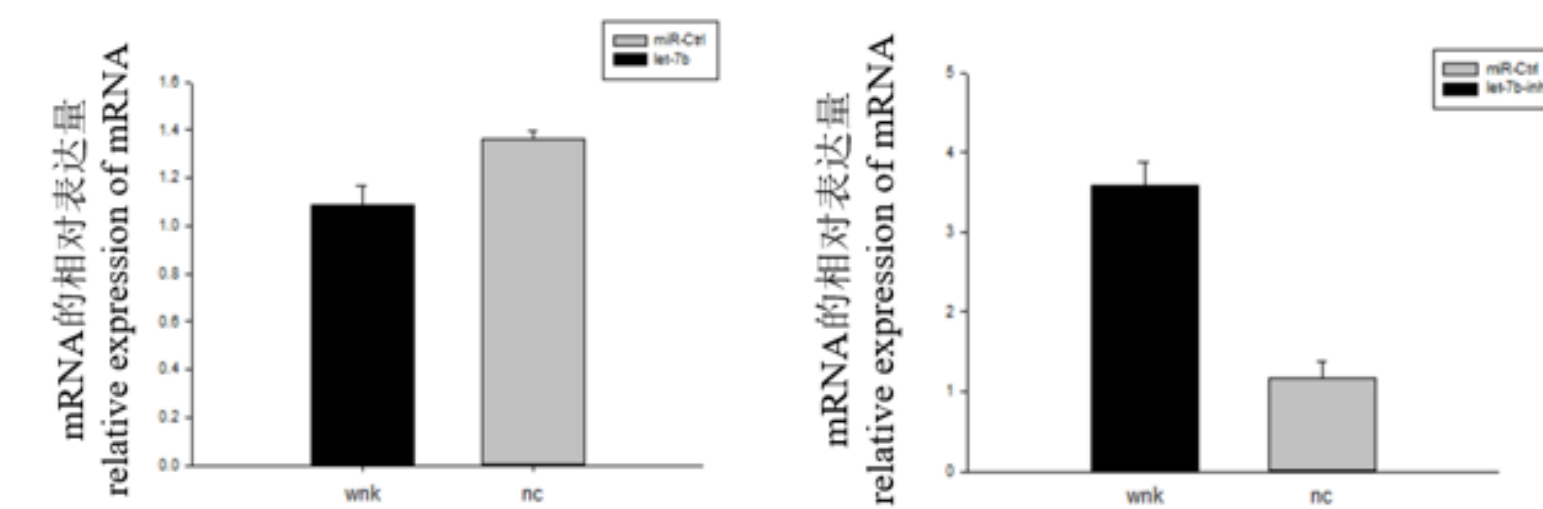
4、let-7b靶向slc4a4、wnk4和hbegf



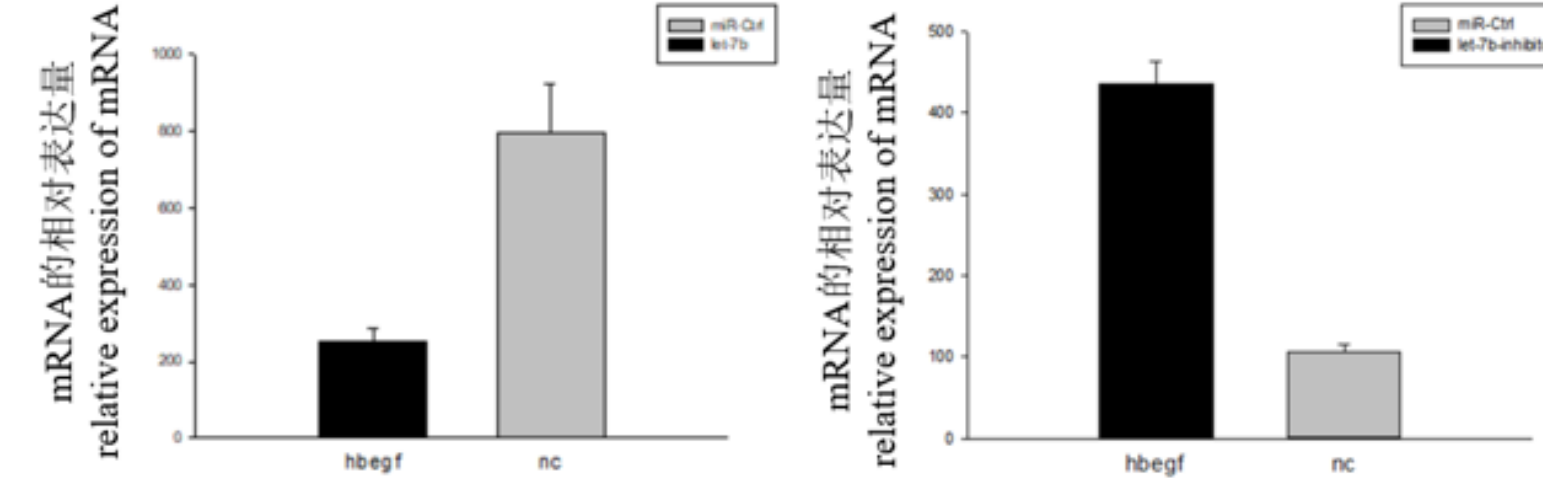
转染let-7b mimics后let-7b的表达量升高，转染let-7b inhibitor后let-7b的表达量降低。



转染let-7b mimics后slc4a4的表达量降低，转染let-7b inhibitor后slc4a4的表达量升高。

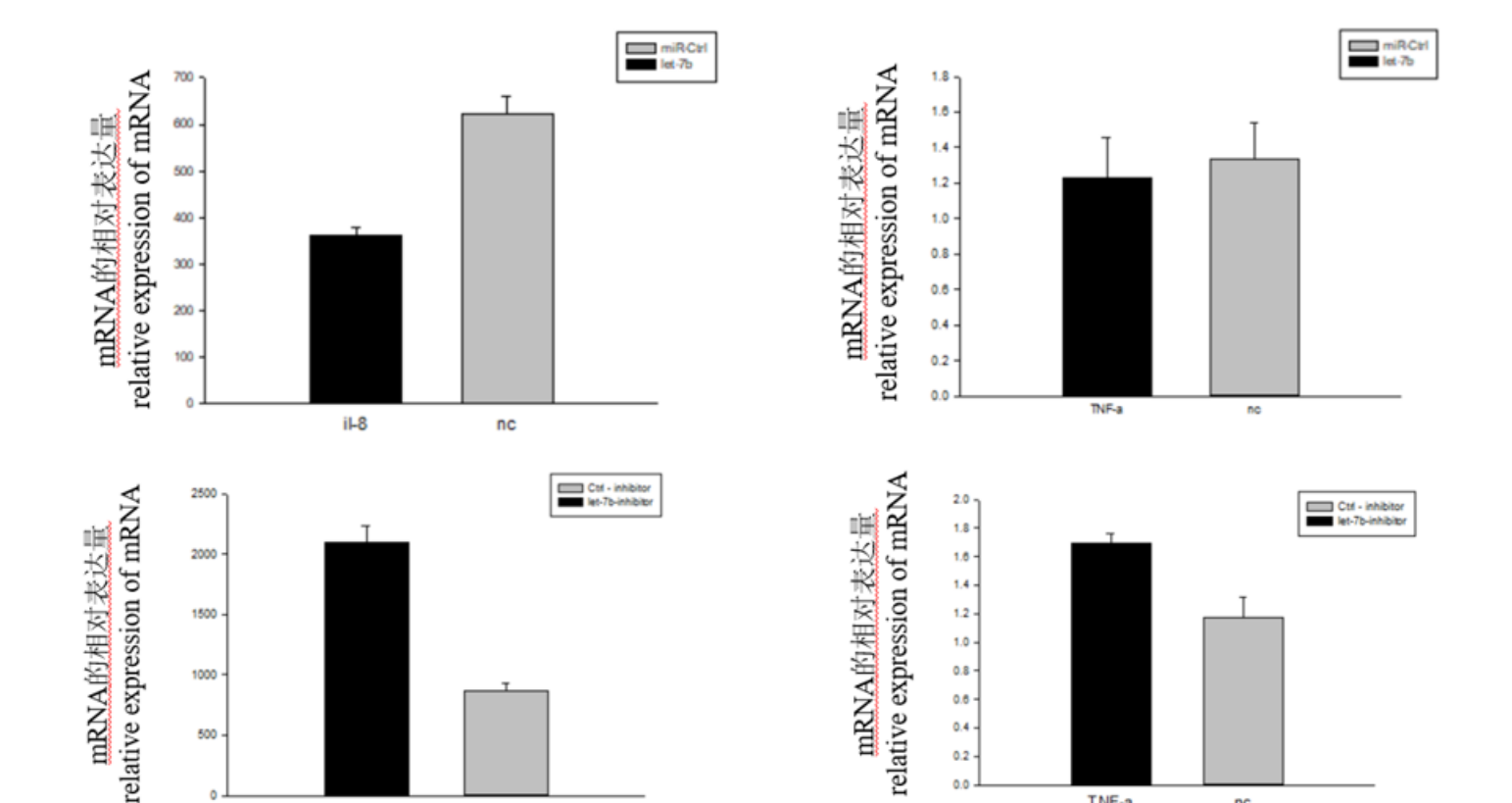


转染let-7b mimics后wnk4的表达量降低，转染let-7b inhibitor后wnk4的表达量升高。



转染let-7b mimics后hbegf的表达量降低，转染let-7b inhibitor后hbegf的表达量升高。

5、let-7b对下游基因的调控作用



let-7b过表达后下游基因il-8和il-1β的表达水平下降,将let-7b抑制后下游基因il-8和il-1β的表达水平上升。

结论

- 1、嗜水气单胞菌感染显著影响let-7b的表达，说明let-7b参与调控草鱼CIK细胞中的免疫应答；
- 2、let-7b可通过靶向slc4a4、wnk4和hbegf影响炎症因子的功能；
- 3、let-7b过表达后降低下游促炎因子il-8和il-1β的表达。