

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (5):564–569; 4 May 2015
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140487

新型隐球酵母基因间来源的小 RNA 功能验证

赵强, 黄怡文, 张萍, 孙小婷, 朱旭东*

南开大学生命科学学院微生物系, 天津 300071

摘要:【目的】验证内源基因间来源的 20–25 nt 的 small RNA (sRNA) 是否具有干扰功能。【方法】通过建立隐球酵母 sRNA 测序文库, 得到约 200 个长度在 20–25 nt 的 sRNAs, 运用建立的验证新型隐球酵母 sRNA 功能报告系统, 对其进行干扰功能验证。【结果】通过 CLC-sRNA 报告系统, 对选取的 sRNA 进行了分子水平的功能验证, 发现一个具有干扰功能的基因间来源的 sRNA。【结论】新型隐球酵母 sRNA 来源具有多样性, 对报告靶基因存在着干扰功能, 其干扰的通路应当是经典 RNAi 通路, 同时, 在无性传递过程中具有稳定性。

关键词: 新型隐球酵母, small RNA, microRNA, RNAi

中图分类号: Q933 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 05-0564-06

真核生物中广泛存在长度约为 20–30 nt small RNAs (sRNAs), 许多 sRNA 参与基因表达调控过程, 特别是沉默过程。根据其前体结构、起源、以及作用机制, sRNA 可以分为三类: miRNA (microRNA)、siRNA (small interfering RNA) 和 piRNA (piwi-interacting RNA) [1–4]。sRNA 对于基因组稳定性、多细胞生物体生长和发育都起着不容忽视的作用 [5–6], 例如, miRNA 一般通过与其靶基因的 3'-UTR 区域互补结合以对靶 mRNA 的转录或翻译发挥抑制功能 [6–9]。sRNA 一般通过 RNAi 途径发挥作用, RNAi 机制在很多真菌中都是保守存在的 [10–11], 或者通过形成异染色质产生沉默, 比如裂殖酵母 [12]。事实上, 真菌中的大多数 sRNA 都为 siRNA, 在新型隐球酵母和粗糙脉孢霉等真菌中大量存在 [10–11, 13–16]。

新型隐球酵母 (*Cryptococcus neoformans*), 属于

担子菌单细胞真菌, 广泛存在于自然界中, 同时也是常见致病真菌, 是研究真菌的模式真菌之一, 遗传背景清晰, 分子生物学工具丰富, 多株隐球菌的全基因组测序和注释也已完成, 拥有 RNAi 过程的关键元件如 Argonaute 蛋白, Dicer 内切酶, 以及 Rdp1 (依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶) [16–19], 其 RNAi 干扰现象也被不同实验室证实。针对 *C. neoformans* 菌株 H99 的 20–25 nt 的 sRNA 深度测序 (deep sequencing) 表明, sRNA 数量极大, 达到百万条以上, 在其他生物中也相似。但是, 这些 sRNA 是否都具有干扰功能是一个重要问题, 找到其中的具有干扰作用的 sRNA 十分困难。

我们前期在新型隐球酵母 JEC21 中克隆鉴定出约 200 条长度为 20–25 nt 的 sRNA 分子 [20], 通过构建一个报告验证系统, 结合生物信息学分析, 我们首次在真菌中发现两个具有干扰能力的 miRNA

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31170138)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-22-23506510; E-mail: xudong82@nankai.edu.cn

作者简介: 赵强 (1986–), 男, 山东人, 博士研究生, 主要从事于分子真菌学研究。E-mail: zq2143740@126.com

收稿日期: 2014-10-12; **修回日期:** 2014-12-11

分子(miR1 和 miR2)^[20], 这两个 miRNA 来源于约 70nt 的前体(和哺乳动物的前体长度相同), 表达具有时序性。本文在前期工作的基础上, 再次克隆鉴定约 200 个 sRNA 分子, 得到一个具有干扰能力的 sRNA, 命名为 sRNA-1, 其来源与 miR1 和 miR2 不同, 产生于基因间区域, 序列为: 5'-UGCGUUCGACACGCGGCAGGCA-3'。以参与漆酶表达的氯离子通道基因 *CLC1* 为报告基因, 融合基因在受到干扰的情况下产生白色菌落(*CLC1* 突变表型, 漆酶缺陷, 不能产生黑色素), 野生型产生黑色菌落, 证明 sRNA-1 是一个具有干扰功能的 sRNA。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH 5 α 感受态细胞, 新型隐球酵母 (*C. neoformans*) JEC21 为野生型菌株, 由本实验室保藏。新型隐球酵母 Tx1 菌株为氯离子通道蛋白基因 *CLC1* 缺失突变株, 不产生黑色素, 作为受体菌株以及黑色素产生的白色负对照。新型隐球酵母 Tx1c 菌株(*CLC1* 基因回补菌株), 新型隐球酵母 CLC-sRNA-1 菌株(含有 *CLC-sRNA-1* 融合基因), 新型隐球酵母 CLC-sRNA-1-m 菌株(*CLC-sRNA-1* 融合基因中 sRNA-1 序列随机突变菌株)。

1.1.2 培养基: YPD 培养基(2% 葡萄糖, 2% 蛋白胨, 1% 酵母提取物, pH 6.2), 0.1% 葡萄糖 Asn 培养基(0.1% 天门冬酰胺, 0.3% KH_2PO_4 , 0.1% 葡萄糖, pH 5.2) 是诱导漆酶产生的培养基, 终浓度 100mg/L 的去甲肾上腺素(nor-epinephrine, NE) 作为底物被加入到 0.1% 葡萄糖 Asn 平板中以观察黑色素产生。

1.1.3 主要试剂和仪器: Invitrogen TRIzol Kit (美国 Invitrogen 公司), *E. coli* DH5 α 感受态细胞(大连宝生物工程有限公司), 内切酶(大连宝生物工程有限公司), DNase I (大连宝生物工程有限公司), MLV 反转录酶(大连宝生物工程有限公司), OligodT (18) (大连宝生物工程有限公司), Small RNA Gel Extraction Kit (大连宝生物工程有限公司), FastStart Universal SYBR Green Master(上海 Roche 公司), 去甲肾上腺素(Sigma 公司), StepOnePlus 实时荧光定

量 PCR 仪器(美国 Applied Biosystems 公司)。

1.2 酵母总 RNA 提取以及实时定量 PCR (qRT-PCR)

将培养 48h 的新型隐球酵母菌体细胞收集, 参照产品说明书, 使用 Invitrogen TRIzol Kit 提取酵母总 RNA。并用 DNase I (60–80 U/ μL) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下消化去除残留 DNA, 反转录反应中使用 1 μg 的总 RNA 作为模板, 并使用 MLV 反转录酶以及 OligodT (18) 进行反转录反应。每 20 μL qRT-PCR 反应体系中加入 cDNA (大约 50 ng), 每种引物的浓度为 300 nmol/L, 实验所用的染料为 FastStart Universal SYBR Green Master, 每一个样品需重复 3 个孔, 本实验中, *ACT1* 基因被用作 qRT-PCR 的内参基因, 空白对照为仅含水和上下游引物, 主要用于排除背景和引物设计缺漏问题。本实验所用水均采用 DEPC 处理的不含 RNA 酶的水。

1.3 sRNA 的克隆

按照 Small RNA Gel Extraction Kit 说明书回收 sRNA。将培养 48h 的新型隐球酵母菌体细胞收集, 用传统的异硫氰酸胍法提取总 RNA, 用 15% PAGE 尿素(7 mol/L) 胶电泳分离 sRNA, 本实验所用的 RNA marker 的条带大小范围为 20nt ~ 100nt。sRNA 的条带大小大约在 22 nt 左右, 回收后的 sRNA 参照 Small RNA Cloning Kit 说明书, 并参照 Jiang 等的方法进行克隆, 即在 sRNA 的 3'端和 5'端加上一个接头(试剂盒供应), 并用 oligo 引物进行扩增得到 cDNA, 扩增得到的 cDNA 连接入 T 载体 pMD20-T, 将其用热激方法转化入 DH 5 α 大肠杆菌感受态细胞, 随机挑选 200 个大肠杆菌转化子进行测序。

1.4 生物信息学方法分析鉴定 sRNA

所有测序得到的 sRNA 序列在 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 和 SGTC (Stanford Genome Technology Center) 数据库中的新型隐球酵母的基因组序列进行 Blast 比对, 为了能够更好的鉴定 sRNA, 所有来自 tRNA 或 rRNA 的 sRNA 首先被排除, 生物信息学分析能够预测 sRNA 及其在基因组上的位置, 通过与已知的植物和哺乳动物的 sRNA 进行比较, 分析 sRNA 的结构特征, 用 Vmir (<http://books.elsevier.com/companions/978012379179>) 分析预测 sRNA 中是否存在发夹结构。

1.5 pBS + CLC + sRNA 报告基因系统的构建

为了验证基因间来源的 sRNA-1 是否具有干扰

功能,将其插入到报告基因 *CLC1* 的 3' UTR 区域,得到融合基 *CLC-sRNA-1*。引物 *CLC-EcoR I* -S/*CLC-Hind III* -A 和 *CLC-sRNA1-Hind III* /*CLC-Xho I* -A 用于扩增 *CLC-1* 基因的开放阅读框和终止子区域,扩增得到的片段分别用 *EcoR I* /*Hind III* ,*Hind III* /*Xho I* 限制性内切酶酶切,将其分别连入 pBluescript SK 质粒(见图 1-A,图 1-B)。表 1 为所用引物序列。作为对照,sRNA-1 的随机突变序列 sRNA1-m,其对应的 cDNA 序列为: 5'-TACTTGCTAAATGAGCCGGTCA-3' 以同样的方式构建报告融合基因。

1.6 新型隐球酵母的转化

Tx1 菌株感受态细胞与 5μg 线性化的质粒混合均匀,用电击方法进行转化(1400V),电击过后的细胞均匀涂布在含有 100μg/mL Hygromycin B 的 YPD 固体培养基的平板中,倒置培养于 28℃ 的培养箱中 48h 左右,挑选其中的 3 个转化子划线纯化。然后将纯化后的转化子涂布于浓度 100mg/L 的去甲肾上腺素的固体 0.1% 葡萄糖 Asn 培养基中,观察漆酶产生情况。

表 1. 本实验所用的引物

Table 1. Primers used in this study

Primer	Sequence (5'→3')
CLC-EcoR I -S	GACCTAGAATTTCATTCAACAAGAAAAGCGGCGTACCGTTCTA
CLC-Hind III -A	TACGGAAGCTTTTCATCCTTGTATTCTTCGTCCAACTCATAG
CLC-Xho I -A	GATTACTCGAGCCTGTGCGGTAGCAAGAACAAGAAG
CLC-sRNA1-Hind III	TTAACGAAGCTTTGCGTTTCGACACGCGGCAGGCATTAAATTTTGTAGACTGACCAGTATCCCG
qCLC-S	AATGACTGTGAATACGGGCG
qCLC-A	CTTGCTCGGACACGAGAATG
qACT-S	ATGGTATTGCCGACCGTATGC
qACT-A	TTTCGGTGGACGATTGAGGG

2 结果和分析

2.1 新型隐球酵母 sRNA 的克隆和分析

为了能够进一步寻找隐球酵母中的 sRNA,我们克隆了 sRNA 反转录得到的 cDNA 小型文库,以 pMD20-T 为载体,得到了大约 20000 个大肠杆菌转化子,并随机挑选了其中的 200 个转化子进行了测序,sRNA 的长度大约在 14 - 25 nt。

2.2 转化子验证

利用 PCR 验证 *CLC-sRNA* 片段转入 Tx1 缺失菌株中。鉴于转化子的筛选标记为潮霉素抗性基因,而带有潮霉素抗性基因的质粒 pBS-HYG 与 pBS-CLC-sRNA 报告质粒共转化,所以需要确认转

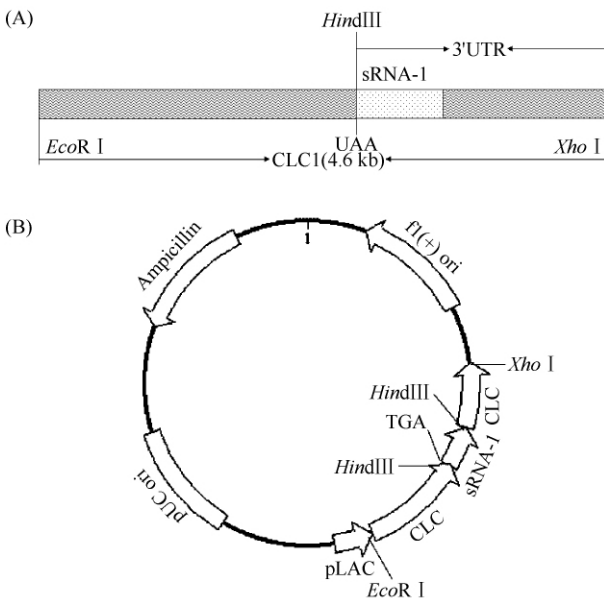


图 1. pBS-CLC-sRNA 报告系统简图 (A) 和 pBS-CLC-sRNA 干扰质粒图谱 (B)

Figure 1. Schematic diagram of pBS-CLC-sRNA reporter system (A); The interfering plasmid pBS-CLC-sRNA (B).

化子能同时拥有 pBS-HYG 与 pBS-CLC-sRNA 片段。我们提取了转化子的基因组,用 PCR 验证 pBS-CLC-sRNA 质粒是否存在。

图(2-A)显示为 Tx1 菌株的 *CLC1* 基因被标记基因 *URA5* 取代突变,通过在基因的 *Pst I* 位点插入 2 kb 的 *URA5* 使其插入失活^[21],在本实验中,我们分别在 *CLC1* 的 287bp 和 2844bp 位点设计引物,转化子的 PCR 能得到两条片段: 2.5kb (来源于基因组)和 550bp (来源于转入片段)。如果 pBS-CLC-sRNA 没有进入细胞,PCR 只能得到一条片段,为 2.5kb(图 2-B)。

2.3 sRNA-1 对报告基因 CLC1 的干扰表型检测

新型隐球酵母的 *CLC1* 基因负责编码氯离子通道蛋白,和铜离子的吸收和内稳态有关^[21, 22],破坏

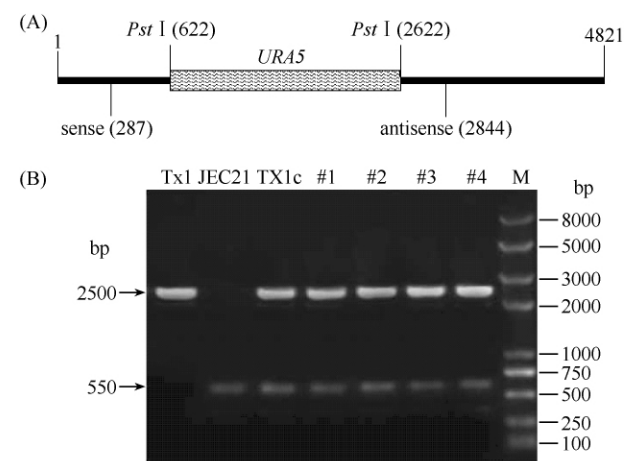


图 2. Tx1 菌株 *CLC1* 基因突变示意图 (A) 和验证 pBS-CLC-sRNA 转化子电泳图 (B)

Figure 2. (A) Schematic diagram of mutated *CLC1* of Tx1 strain; (B) The electrophoresis detecting the transformed plasmid pBS-CLC-sRNA in the transformants.

此基因能够影响漆酶 (Lac1) 获得铜离子, 导致培养基中的去甲肾上腺素 (NE) 不能被氧化产生黑色素, Tx1 (*CLC1* 缺失) 在加有 NE 的低葡萄糖 (0.1% 葡萄糖) 诱导培养基中产生的菌落为白色 (野生型为黑色)。

我们将构建的 pBS-CLC-sRNA-1 质粒与 pBS-HYG 质粒分别线性化后电转入 Tx1 菌株, 如果 sRNA-1 有干扰作用, 则 *CLC1* 基因受到干扰降解, Tx1 菌株在含有 NE 的低葡萄糖 (0.1% 葡萄糖) 培养基中影响漆酶获得铜离子, 导致菌落呈白色; 如果 sRNA-1 不具有干扰作用, 则漆酶正常, 产生黑色菌落。我们将含有 sRNA-1 的转化子在 30℃ 的 YPD 试管中培养过夜, 然后收集菌体, 将约 107 个细胞在含有 NE 的低葡萄糖 (0.1% 葡萄糖) 诱导培养基上涂布成均匀的菌苔, 大约 19h 后观察表型, 如图 3 所示, 含有 CLC-sRNA-1 报告系统的转化子菌落在含有 NE 的低葡萄糖 (0.1% 葡萄糖) 诱导培养基上的菌落与负对照的 Tx1 菌落颜色相同, 均为白色, 而 CLC-sRNA-1-m (*CLC-sRNA-1* 融合基因中 sRNA-1 的

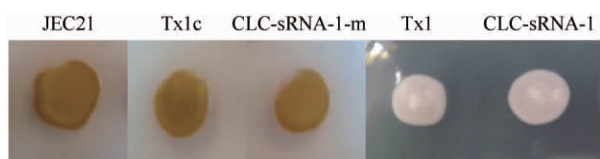


图 3. 含有 sRNA-1 的转化子在 0.1% 葡萄糖 Asn 培养基上的表型

Figure 3. Phenotype of the transformants containing sRNA-1 on low-glucose (0.1%) Asn agar with NE.

序列随机突变) 和野生型菌株为黑色, 说明插入的 sRNA-1 干扰了 *CLC1* 基因的表达, 从而不能产生黑色素。

2.4 Real-time PCR 验证 sRNA-1 对 *CLC1* 基因的干扰功能

本实验采用 Real-time PCR 从转录水平上检测 *CLC1* 报告基因的表达量, 从而考察 sRNA-1 对 *CLC1* 报告基因的干扰功能。其结果如图 4 所示, 我们可以看出, 与野生型和回补菌株 Tx1c 相比, 含有 CLC-sRNA-1 报告系统的转化子中 *CLC1* 基因的 mRNA 转录水平发生了明显的下调。Ago1, Rdp1, 和 Dcr2 为 RNAi 干扰途径的主要组分, 我们的前期实验证明 Rdp1 对 sRNA 干扰作用影响最大^[23]。为了验证 Rdp1 对 sRNA 干扰作用的影响, 我们还构建了以 URA5 作为报告基因的 URA5-sRNA 报告系统, 结果证明 Rdp1 为 sRNA 发挥干扰作用的核心组件^[24]。所以我们认为 sRNA-1 与我们之前发现的 miRNA (miR1 和 miR2)^[20] 一样, 应当也是通过经典的 RNAi 的途径对 *CLC1* 基因发挥干扰功能的。

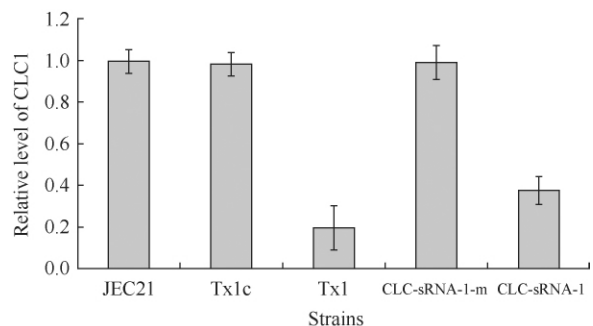


图 4. 实时定量检测 JEC21 野生型菌株, Tx1 菌株, Tx1c 回补菌株, CLC-sRNA-1-m 菌株, CLC-sRNA-1 菌株中 *CLC1* 基因相对表达量

Figure 4. Quantification for the expression of *CLC1* by qRT-PCR in the strains of JEC21, Tx1c, Tx1, CLC-sRNA-1-m, CLC-sRNA-1.

2.5 sRNA 的前体分析

运用 Vmir 软件分析, 此 sRNA-1 对应的基因组位点周围的序列似乎不能形成有侧翼的发夹环结构。这预示着 sRNA-1 的起源可能与 miR-1 和 miR-2 有所不同。

2.6 sRNA 干扰作用可遗传性分析

为了检测带有 sRNA-1 的菌株中干扰作用的稳定性, 我们将带有 pBS-CLC-sRNA-1 片段的转化子稀释到 10^6 左右, 涂布于含有 NE 的低葡萄糖 (0.1% 葡萄糖) 诱导培养基中培养, 将性状稳定的白色单菌落重复上述步骤进行 10 代培养, 并观察每

次传代的结果,发现长出的菌落均为白色,我们采用 Real-time PCR 的方法进一步从转录水平上检测 *CLC1* 报告基因的表达式,我们可以看出,与野生型和回补菌株 Tx1c 相比,含有 sRNA-1 的 CLC 报告系统的转化子即使经过 10 代培养,其 *CLC1* 基因的 mRNA 转录水平仍然存在着明显的下调(图 5)。说明在新型隐球酵母中,sRNA-1 的干扰作用建立之后能够在无性生长条件下稳定传代。

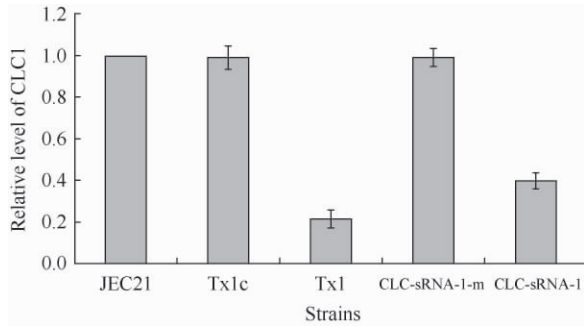


图 5. 实时定量检测经 10 代培养后 JEC21 野生型菌株, Tx1 菌株, Tx1c 回补菌株, CLC-sRNA-1-m 菌株, CLC-sRNA-1 菌株中 *CLC1* 基因相对表达量

Figure 5. Quantification for the expression of *CLC1* by qRT-PCR in the strains of JEC21, Tx1c, Tx1, CLC-sRNA-1-m, CLC-sRNA-1 after ten generation of cultures.

3 讨论

本实验构建了新型隐球酵母 sRNA 克隆文库,并从中选取了 200 个转化子进行生物信息学和分子生物学验证,得到其中一个起源于基因间的干扰 small RNA,说明干扰 sRNA 的起源在隐球菌中具有多样性。构建的 CLC-sRNA 报告基因检测系统及其负对照系统,我们可以发现新型隐球酵母细胞内的 sRNA-1 结合在报告基因的 3' UTR 区,能够导致 *CLC1* 基因的降解,使报告基因在相应的缺失菌株中不能实现回补功能,从而验证了新型隐球酵母中小 RNA 靶序列库中的 sRNA-1 具有干扰功能,再一次证明该报告系统研究隐球菌 siRNA 中的作用^[20]。我们将阳性转化子传代培养,发现其干扰表型可以稳定遗传,说明 sRNA-1 干扰具有可遗传性。Vmir 软件对 sRNA-1 的前体进行分析,此 sRNA 不能形成有侧翼的发夹环结构。这预示着 sRNA 的结构同样存在着多样性。遗憾的是,sRNA-1 的天然靶序列以及它可能参与细胞过程仍然是未解之谜,这也是众多小 RNA 研究中的一个难点,进一步分析可能有助于解释内源 siRNA 的生物学意义。

参考文献

- [1] Ghildiyal M, Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature Reviews Genetics*, 2009, 10 (2) : 94-108.
- [2] Wang L, Wang MB, Tu JX, Helliwell CA, Waterhouse PM, Dennis ES, Fu TD, Fan YL. Cloning and characterization of microRNAs from *Brassica napus*. *FEBS Letters*, 2007, 581 (20) : 3848-3856.
- [3] Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 2009, 136 (4) : 642-655.
- [4] Halic M, Moazed D. Dicer-independent primal RNAs trigger RNAi and heterochromatin formation. *Cell*, 2010, 140 (4) : 504-516.
- [5] Ambros V. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. *Cell*, 2003, 113 (6) : 673-676.
- [6] Carrington JC, Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science*, 2003, 301 (5631) : 336-338.
- [7] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 2009, 136 (2) : 215-233.
- [8] Hyun S, Lee JH, Jin H, Nam J, Namkoong B, Lee G, Chung J, Kim VN. Conserved microRNA miR-8/miR-200 and its target USH/FOG2 control growth by regulating PI3K. *Cell*, 2009, 139 (6) : 1096-1108.
- [9] Tay Y, Zhang J, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*, 2008, 455 (7216) : 1124-1128.
- [10] Lee HC, Chang SS, Choudhary S, Aalto AP, Maiti M, Bamford DH, Liu Y. qiRNA is a new type of small interfering RNA induced by DNA damage. *Nature*, 2009, 459 (7244) : 274-277.
- [11] Lee HC, Li LD, Xue ZH, Crosthwaite SK, Pertsemilidis A, Lewis ZA, Freitag M, Selker EU, Mello CC, Liu Y. Diverse pathways generate microRNA-like RNAs and Dicer-independent small interfering RNAs in fungi. *Molecular Cell*, 2010, 38 (6) : 803-814.
- [12] Buhler M, Moazed D. Transcription and RNAi in heterochromatic gene silencing. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2007, 14 (11) : 1041-1048.
- [13] Catalanotto C, Nolan T, Cogoni C. Homology effects in *Neurospora crassa*. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 254 (2) : 182-189.
- [14] Drinnenberg IA, Weinberg DE, Xie KT, Mower JP, Wolfe KH, Fink GR, Bartel DP. RNAi in budding yeast. *Science*, 2009, 326 (5952) : 544-550.
- [15] Liu H, Cottrell TR, Pierini LM, Goldman WE, Doering TL. RNA interference in the pathogenic fungus

- Cryptococcus neoformans*. *Genetics*, 2002, 160 (2) : 463–470.
- [16] Wang XY, Hsueh YP, Li WJ, Floyd A, Skalsky R, Heitman J. Sex-induced silencing defends the genome of *Cryptococcus neoformans* via RNAi. *Genes & Development*, 2010, 24 (22) : 2566–2582.
- [17] Idnurm A, Bahn YS, Nielsen K, Lin XR, Fraser JA, Heitman J. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3 (10) : 753–764.
- [18] Dang Y, Yang Q, Xue Z, Liu Y. RNA interference in fungi: pathways, functions, and applications. *Eukaryot Cell*, 2011, 10:1148–1155.
- [19] Loftus BJ, Fung E, Roncaglia P, Rowley D, Amedeo P, Bruno D, Vamathevan J, Miranda M, Anderson IJ, Fraser JA, Allen JE, Bosdet IE, Brent MR, Chiu R, Doering TL, Dontin MJ, D'Souza CA, Fox DS, Grinberg V, Fu JM, Fukushima M, Haas BJ, Huang JC, Janbon G, Jones SJM, Koo HL, Krzywinski MI, Kwon-Chung JK, Lengeler KB, Maiti R, Marra MA, Marra RE, Mathewson CA, Mitchell TG, Pertea M, Riggs FR, Salzberg SL, Schein JE, Shvartsbeyn A, Shin H, Shumway M, Specht CA, Suh BB, Tenney A, Utterback TR, Wickes BL, Wortman JR, Wye NH, Kronstad JW, Lodge JK, Heitman J, Davis RW, Fraser CM, Hyman RW. The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science*, 2005, 307: 1321–1324.
- [20] Jiang N, Yang Y, Janbon G, Pan J, Zhu X. Identification and functional demonstration of miRNA in the fungus *Cryptococcus neoformans*. *PLoS One*, 2012, 7 (12) : e52734.
- [21] Zhu X, Williamson PR. A CLC-type chloride channel gene is required for laccase activity and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, 2003, 50 (4) :1271–1281.
- [22] Zhu C, Jiang N, Xiao D, Pan J, Zhu X. Chloride channel-dependent copper acquisition of laccase in the basidiomycetous fungus *Cryptococcus neoformans*. *Science China Life Sciences*, 2010, 53 (1) :125–130.
- [23] 杨亚萍. 新型隐球酵母内源干扰性 microRNA 的功能验证. 南开大学硕士学位论文, 2012.
- [24] 孙智雄. 新型隐球酵母中 microRNA 的研究和葡萄糖抑制相关基因的敲除. 南开大学硕士学位论文, 2012.

Interfering effect of an intergenic-derived sRNA of *Cryptococcus neoformans*

Qiang Zhao, Yiwen Huang, Ping Zhang, Xiaoting Sun, Xudong Zhu*

State Key Program of Microbiology and Department of Microbiology, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract: [Objective] We demonstrated the interfering effect of a new intergenic-derived sRNA of *Cryptococcus neoformans*. [Methods] We constructed a library of sRNAs from 20 to 25 nt, and used a reporter gene *CLC1* that was fused to the testing sRNAs to show the interference effect, *i. e.* the degradation of the *CLC1* would gene rate an albino phenotype of the transformants. [Results] Through the CLC-sRNA reporter system, we acquired one sRNA, sRNA-I, located to an intergenic region of the genome of *C. neoformans*, that displayed interfering effect on *CLC1*. [Conclusions] In *C. neoformans*, the origination of sRNA may be diverse. The endogenous sRNA should play interfering function via the canonical RNAi pathway.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*, small RNAs, miRNAs, RNAi

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31170138)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-22-23506510; E-mail: xudong82@nankai.edu.cn

Received: 12 October 2014/ Revised: 11 December 2014