

日本七鳃鳗物种特异性 microRNAs 及其前体的识别与验证

刘欣^{1,2}, 张洁^{1,2}, 赵春晖^{1,2}, 李铁松^{1,2}, 王继红^{1,2}, 李庆伟^{1,2}

1. 辽宁师范大学生命科学学院, 大连 116081;

2. 辽宁师范大学七鳃鳗研究中心, 大连 116081

摘要: MicroRNAs(miRNAs)对参与多种生物代谢过程的基因在转录及转录后水平进行负调控。近年来, 随着深度测序及芯片技术的应用, 有关 miRNA 的发现和功能分析在植物和动物中得到广泛研究。文章利用第二代测序技术对日本七鳃鳗(*Lampetra japonica*)白细胞的小 RNA 进行了高通量测序, 共得到 5 207 787 条小 RNA 序列, 其中 4 739 346 条序列可以拼接为 10 989 种 miRNA 变体。基于序列相似性分析, 发现这 10 989 个变体序列与 306 个已知的保守 miRNA 家族成员序列相匹配; 其中, 6 个保守 miRNA 家族成员呈极高丰度表达, 表明 miRNA 在物种间具有保守性。70 个未注释序列被预测为新的 miRNA。通过 miRNA 微阵列技术鉴定与验证了 34 个新预测的 miRNA 在免疫处理的日本七鳃鳗白细胞中表达, 其中 16 个 miRNA 前体的最低折叠自由能系数大于 0.85, 说明日本七鳃鳗存在特异性 miRNA。这些物种特异性 miRNAs 的存在可能在日本七鳃鳗的白细胞生长、发育和对疾病的反应中发挥重要的调控作用。

关键词: 日本七鳃鳗; 物种特异性 miRNA; 高通量测序; 基因芯片

The identification and verification of species-specific microRNAs and their precursors in *Lampetra japonica*

Xin Liu^{1,2}, Jie Zhang^{1,2}, Chunhui Zhao^{1,2}, Tiesong Li^{1,2}, Jihong Wang^{1,2}, Qingwei Li^{1,2}

1. School of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116081, China;

2. Lamprey Research Center, Liaoning Normal University, Dalian 116081, China

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) negatively regulate genes which are involved in various biological processes of metabolism at both transcriptional and post-transcriptional levels. In recent years, the existence and function of miRNAs have been extensively studied in plants and animals with the application of deep sequencing and microarray technology. In this study, small RNAs from leucocytes of *Lampetra japonica* (*L. japonica*) were sequenced using the second generation high-throughput sequencing technology. A total of 5 207 787 small RNA sequences were identified, and 4 739 346 of them assembled into 10 989 variants. Based on sequence similarity analysis, the sequences of these variants matched known miRNAs of 306 conserved families, among which 6 conserved miRNA family members ex-

收稿日期: 2014-11-25; 修回日期: 2015-01-19

基金项目: 国家重大基础研究发展规划项目(973 计划)(编号: 2013CB835304)和国家自然科学基金项目(编号: 31271323)资助

作者简介: 刘欣, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 细胞生物学。E-mail: liuxin@lnnu.edu.cn

通讯作者: 李庆伟, 教授, 博士生导师, 研究方向: 细胞生物学。E-mail: liqw@263.net

DOI: 10.16288/j.yczz.14-411

网络出版时间: 2015-1-21 10:52:51

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20150121.1052.001.html>

pressed at an extremely high level which reflected the conservatism of miRNAs among species. In addition, 70 unannotated sequences were predicted to be new miRNAs, and 34 of them were further verified expressing in antigen-treated *L. japonica* leucocytes by miRNA microarray assay. Moreover, the minimal folding free energy indexes for 16 of the 34 miRNA precursors exceed 0.85, indicating the existence of species-specific miRNAs in *L. japonica* which may play important roles in regulating, growth, development and disease response of *L. japonica* leukocytes.

Keywords: *Lampetra japonica*; species-specific miRNA; high-throughput sequencing; microarray assay

20 世纪 90 年代, Lee 等^[1]首次在线虫(*Caenorhabditis elegans*)中发现一种内源的、长约 22nt 的非编码小 RNA, 命名为 lin-4; lin-4 通过 RNA-RNA 的相互作用方式参与对线虫胚胎后期发育基因 lin-14 的调控。2000 年, Reinhart 等^[2]在 *C. elegans* 中又发现了第二个长约 21nt 的非编码小 RNA——let-7, 作为时序调控基因 lin-14、lin-28、lin-41、lin-42 和 daf-12 的开关基因, let-7 失活或过表达可导致线虫幼虫的滞育或早熟。

2001 年, Lagos-Quintana 等^[3]从果蝇(*Drosophila melanogaster*)和人体中克隆了 49 个类似线虫 lin-4 的小 RNA 基因, 并把它们正式定名为 microRNA (miRNA); 研究发现, 无脊椎动物和脊椎动物存在的这些新的 miRNA 在序列上高度保守。至 2001 年底, 多个研究小组通过直接对小 RNA 克隆和测序从各种动物中鉴别出数百个 miRNA 基因^[4,5]。之后, 随着多种模式生物基因组测序工作的相继完成使得全基因组搜索 miRNA 成为可能^[6]。结合分子克隆和计算机识别方法, 在动物^[7~9]、植物^[10~14]甚至病毒中^[15,16]确定了成千上万的 miRNA 基因, 仅在人类就验证了 2558 个 miRNAs (<http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl?org=hsa>)^[17]。对部分 miRNAs 的功能研究分析提示: miRNAs 参与生命过程中一系列的重要进程, 包括发育进程^[2]、细胞增殖与凋亡^[18]、脂肪代谢^[19]、造血过程^[20]、生殖干细胞自我更新^[21]及肿瘤发生^[22]等。

随着第二代高通量测序技术的发展, 已在越来越多的物种中发现了新的 miRNA 基因^[23~26]。七鳃鳗属于圆口纲、七鳃鳗目, 是迄今为止最原始的无颌类脊椎动物, 是现存脊椎动物亚门中最古老的物种^[27]。长久以来, 七鳃鳗在进化上因联系着脊椎动物与无脊椎动物而具有极高的研究价值。目前, 国内外对七鳃鳗 miRNA 的研究很少, 仅见 Heimberg 等^[28]于 2010 年采用小 RNA 测序和基因组检索方法

对海七鳃鳗(*Petromyzon marinus*)、普氏七鳃鳗(*Lampetra planeri*)和盲鳗(*Myxine glutinosa*)的 miRNA 进行了识别和鉴定, 并以七鳃鳗和盲鳗的 miRNAs 作为保守的遗传标记对它们之间的系统演化地位进行了讨论。由于 miRNA 具有种间保守性、组织表达特异性和时序性, 本文运用高通量测序以及基因芯片技术在日本七鳃鳗(*Lampetra japonica*)免疫激发后的白细胞中发现和鉴定免疫组织中表达保守的 miRNA 以及物种特异性 miRNA, 以期对未来探索 miRNA 在其免疫应答过程中的调控作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

日本七鳃鳗捕获自黑龙江省松花江流域同江地区, 活体置于实验室水族箱驯养(2~5)。1 周后选取 32 条无外伤、健康的个体(体长 35~55 cm), 以腹腔注射 100 μ L 复合抗原进行免疫刺激。复合抗原用 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.0)配制, 含大肠杆菌(*Escherichia coli* DH5 α) (TaKaRa, Dalian)、灭活的金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) (TaKaRa, Dalian) 和啤酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*) (市售)各 1×10^7 个/mL。经过 3 次加强免疫(每周 1 次), 末次免疫后 3 d 断尾取血, 采用 ficoll 密度梯度离心法进行单核白细胞分离^[29]。

1.2 日本七鳃鳗小 RNA 测序及分析

使用 RNAiso Reagent (TaKaRa, Dalian)提取日本七鳃鳗白细胞总 RNA, 在获得符合测序标准的总 RNA 样本后, 委托深圳华大基因股份有限公司构建测序文库并用 Illumina GA IIx 进行测序及分析。经 Solexa 测序, 获得 35nt 序列, 通过去接头、去低质量、去污染、统计序列长度分布等过程完成初级分

析。将初级分析得到的序列按照文献[30]中的生物信息分析流程及分析软件(包括 BLAST 和华大基因自主开发的分析软件 Tag2annotation)进行分类注释,获得样品中包含的各种 RNA 及表达量信息。将其中 miRNA 片段与 miRBase17.0 中所有动、植物的 miRNA 成熟序列进行比对进行注释,统计在样品中出现的 miRNA 家族(不分物种)、序列及其数量。余下的未注释片段以近缘种海七鳃鳗(*P. marinus*)基因组 (http://asia.ensembl.org/Petromyzon_marinus/Info/Index)为参考基因组进行新 miRNA 及其前体的预测。预测软件采用华大基因自主开发的分析软件 MIREAP (<http://sourceforge.net/projects/mireap/>)^[30]。利用 mFOLD 软件(<http://mfold.rit.albany.edu/?q=mfold/Structure-display-and-free-energy-determination>)计算获得茎环结构的最小折叠自由能(MFE, ΔG 值(kcal/mol))。以最小自由能指数(MFEI, $MFEI = (MFE / \text{前体序列长度}) \times 100 / (G\% + C\%)$)大于 0.85 为鉴定 miRNA 前体的标准^[31]。

1.3 miRNA 基因芯片实验与分析

miRNA 的定制基因芯片检验工作委托美国 LC Sciences 公司进行实验与分析。在 μ Paraflo^[32]微流体芯片上,每条检测探针使用 PGR(photogenerated reagent)化学法进行原位合成。被检测目标选自 miRBase 中几种低等脊椎动物的 miRNA(如海七鳃鳗 301 条;佛罗里达文昌鱼(*Branchiostoma floridae*)189 条;斑马鱼(*Danio rerio*)248 条;铅点东方鲀(*Fugu alboplumbeu*)109 条;玻璃海鞘(*Ciona intestinalis*)511 条;非洲爪蟾(*Xenopus Laevis*)168 条;囊舌虫(*Saccoglossus kowalevskii*)114 条)以及在日本七鳃鳗中预测的新 miRNA 70 条。杂交后检测使用标记特异性的 Cy5 荧光染料。利用激光扫描仪(GenePix 4000B, Molecular Device)采集杂交图像并使用 Array-Pro 图像分析软件(Media Cybernetics)进行图像数字化转换。数据分析首先是减除背景值,然后使用 LOWESS 过滤(Locally-Weighted Regression)进行信号归一化^[33]。被列为可检测的转录子必须至少符合两个条件:信号强度 $>3 \times$ (背景标准偏差)并且点变异系数(spot CV) <0.5 。CV 值通过计算(标准偏差)/(信号强度)获得。只有当超过 50%的重复探针的

信号值大于检测水平,才认为该转录子可以被检测^[33]。

2 结果与分析

2.1 小 RNA 测序结果

通过高通量测序,最终获得日本七鳃鳗各种小 RNA 分子数量见表 1。共获得 5 207 787 个小 RNA 读数(Read),其中 miRNA 有 4 739 346 个读数,占 91%,拼接后可归为 10 989 种一致序列片段。有 7.54% 的小 RNA 片段属于未注释的未知序列,还有少量的转运 RNA(tRNA, 0.74%)、核糖体 RNA(rRNA, 0.66%)、小核 RNA(snRNA, 0.05%)和核仁小 RNA(snoRNA, 0.01%)等,说明测序结果较好。日本七鳃鳗 miRNA 成熟序列的长度和其他物种一样,大部分(占总数的 87.66%)集中在 20~24nt 之间(图 1)。

2.2 保守 miRNA 家族表达谱

通过与数据库比对,上述 10 989 条 miRNA 一致序列被注释为 306 个保守 miRNA 家族的不同变体。其中 201 个保守 miRNA 家族的各个变体表达丰度之和小于 10 个读数,说明大多数(65.7%)保守 miRNA 为低丰度表达;75 个保守 miRNA 家族的各个变体表达丰度之和介于 10~1 000 之间,属于中丰度表达;30 个 miRNA 家族的表达丰度高于 1 000 个读数(表 2),从编号可以看出它们绝大多数为最先被发现的 miRNA 家族(15 个编号小于 100,9 个编号小于 200)。这 30 个家族共包括 9 560 个 miRNA 变体,由 4 729 961 个读数组成,分别占保守 miRNA 家族(共 10 989 条 miRNA)一致序列的 87.0%和总读数(4 739 346)的 99.8%。其中,let-7、miR-146、miR-184、miR-143、miR-30、miR-142 等 6 个家族的 miRNA 表达丰度均

表 1 高通量测序获得七鳃鳗小片段 RNA 种类及数量

分类	小 RNA 类型	百分比 (%)	小 RNA 数量 (Read)	百分比 (%)
miRNA	10 989	8.42	4 739 346	91.00
rRNA	8 810	6.75	34 401	0.66
重复相关小 RNA	6	0.00	7	0.00
snRNA	482	0.37	2 556	0.05
snoRNA	174	0.13	428	0.01
tRNA	5 283	4.05	38 534	0.74
未注释片段	104 752	80.27	392 515	7.54
总计	130 496	100.00	5 207 787	100.00

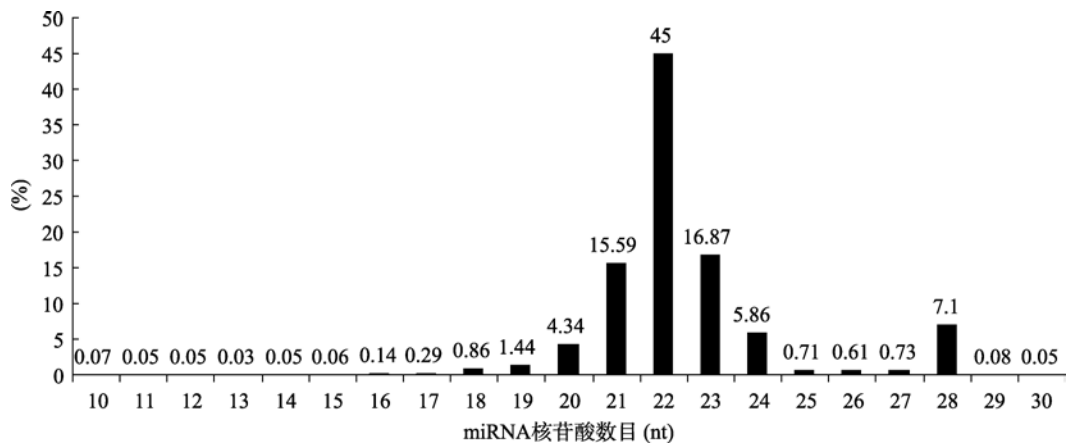


图 1 七鳃鳗 miRNA 成熟序列核苷酸分布情况

表 2 日本七鳃鳗高丰度表达的 miRNA 家族

miRNA 家族	miRNA 变体数	miRNA 数量 (Read)	miRNA 家族	miRNA 变体数	miRNA 数量 (Read)	miRNA 家族	miRNA 变体数	miRNA 数量 (Read)
let-7	2 789	2 348 337	miR-223	70	17 593	miR-1308	203	4 985
miR-146	1 069	1 092 556	miR-15	217	16 225	miR-181	97	4 039
miR-184	204	322 376	miR-25	335	12 717	miR-125	96	3 950
miR-143	549	307 713	miR-155	64	10 382	miR-216	65	2 729
miR-30	963	224 071	miR-190	86	10 067	miR-19	51	1 552
miR-142	639	163 885	miR-217	121	9 115	miR-9	46	1 508
miR-26	387	62 514	miR-456	167	6 782	miR-29	84	1 467
miR-17	292	36 125	miR-1959	191	5 951	miR-1	59	1 369
miR-99	264	30 378	miR-92	109	5 105	miR-22	40	1 319
miR-27	177	18 857	miR-24	56	5 032	miR-130	70	1 262

超过 10 万个读数，占总读数的 94.1%。这些结果表明，极少数保守 miRNA 家族的成员呈极高丰度表达，反映出 miRNA 在物种间具有保守性。

2.3 七鳃鳗新 miRNA 的预测及验证

利用高通量测序未注释的小 RNA 片段，用华大基因自主构建的 miRNA 及其前体预测软件 MIREAP 共预测得到 70 个新的 miRNA 成熟序列。通过定制芯片微阵列分析验证(表 3)，有 35 个预测的新 miRNA 成熟序列的检测信号符合信号强度大于基值的 3 倍且点变异系数(spot CV)小于 0.5 这两个检测条件，说明它们是真实存在的。

从表 3 中可见，有 8 种预测的物种特异性 miRNA (Ljm-058、Ljm-037、Ljm-016、Ljm-073、Ljm-004、Ljm-049、Ljm-023 和 Ljm-065)的信号强度高于 1 000，占 23.5%；尤其是 Ljm-058、Ljm-037 和 Ljm-073 不

仅芯片检测信号强度高，而且在测序检测中读数值也高。信号强度介于 100~1 000 之间的有 16 个物种特异性 miRNA，占 47.1%。信号强度小于 100 的有 10 个，占 29.4%。由此可见，大多数预测的物种特异性 miRNA 在受抗原免疫激发后的日本七鳃鳗免疫细胞中均有较高水平的表达。

对新预测的物种特异性 miRNAs，其鉴定还需要预测是否存在能折叠成较稳定的发卡结构的前体序列的支持。根据海七鳃鳗基因组数据，预测的物种特异性的 miRNA 的成熟和前体序列以及前体序列的二级结构(GenBank 序列登录号：KJ031059~KJ031093)见表 4。这些 miRNA 前体的最小折叠自由能介于-19.7 kcal/mol~-49.56 kcal/mol 之间，最小折叠自由能系数介于 0.48~1.64 之间。有 16 个 miRNA 前体的最小折叠自由能系数大于 0.85。

新 预 测 miRNA	miRNA 成熟及前体序列	二级结构预测	Mfe (kcal/mol)	MfeI
Ljm-028-3p	GATGGTGATAGGTGCAGTGCTGCAAGTTACTCTTTTGATGAAAT TTACATAGTGATT TGTGATTGCGGGCTACTGAGGC CAGATTCC AT	.(((.((((.((((((((((((((((((((((((((((.....)))...))))))))).)).)).).).)))))	-30.2	0.81
Ljm-030-3p	TCCAGTGCTGGAAGCTTCTGCAGGGAACGGACTTCACTCAGC TGAGTTGACGCGACTGAATTGATT CAACTCCTTGAAGAAGC TCCAGCAGGTGG	.(((.((((.((((((((((((((((((((((((((((.....)))...))))))))).)).)).).).)))))	-38.2	0.75
Ljm-031-3p	AATCTTCATTGAAGCTTTCGTGACTGCAGGAATCCATACTCT TTGGCTCTTT TCGGTAAAGTCACGTAGGCTC ATCCCCTGAT	.(((.....(((.((((.((((((((((((((((((((((.....)))... ..)))))))).)))))).....)))	-21.7	0.59
Ljm-033-5p	CTTTGGTTATTT TCGGTAAAGTCACGTAGGTG CAAATTT CGGA TTCCAGTACCTACGTGACTTTACCGAAAGAAACCAAAGA	((((((((.((((((((((((((((((((((((((((.....))))))...)))))))))).)))))))).	-49.56	1.5
Ljm-034-3p	CTTTGGTTCCTTCGGTAAAGTCGCGTAGGTACAACATGAAATA AATCACGTTATTT CGAACCTACGTGACTTTACCGAATGAACCA AAGA	((((((((.((((((((((((((((((((((((((((.....))))))...)))))))))).)))))))).	-50.9	1.64
Ljm-037-5p	CGCGCGGGGG AAAAGTGCAAATAGTGGTAGGTAGT GATCAC TGCCGTCTGCCTACTCCATT TGCATTTGGCCTCCGTGCGT	((((((((.((((((((((((((((((((((((((((.....)))... ..)))))))).)))))))).	-46.4	1.03
Ljm-039-5p	TTATACAGGTAA CGAGCTGAGATTAGGAGA ACGCTCTTAAA GGGAGTGCTCCTAA ACTACGCTTGTTACCTGTATAAA	((((((((.((((((((((((((((((((((((((((.....))))))...)))))))))).)))))))).	-51.8	1.62
Ljm-040-5p	ACACGTATATA CCGGATTATAAGACGCACCCG CACATCATTT CCTTTAAACGCAGGGGAAACGTGCGCCTGATGATCCGGTGA ACATGGTC	...(((.((((.((((((((((((((((((((((((((((.....))))...))))).))))).)))))))).	-29.2	0.65
Ljm-041-5p	GTTGCCCAT TACGATCTGGCTTCTGAGGCTAGCA ACCACT GCGTTGAGGCTAGCAACCGCTGCGTTGCT	((((.(.(.(((.(((((((((((((((((((((((((.....))))))...)))..)).)).)).	-19.2	0.48
Ljm-044-5p	TGTCCCGCT GAGGTCAGGATGGGCAGCAATGCGT GACTAG ATCCTGTATTGCACTCGTCCCGGCC TTAGCGAGATT	.(((.(((((((.(((((((((((((((((((((((((.....)))...))))).)))))))).	-40.7	0.95
Ljm-047-3p	TTTTTTTCTATCTACATGACTTTACCGAAAGAAACAAAAATA TGAATTCCATACTCTTTGGTCTTT TCGGTAAAGTCATGTAGG TACAGTGAGGAA	.((((((((((((((((((((((((((((((((((((.....))))...).))))).)))))))).	-44	1.38
Ljm-049-5p	TCAATGTAAAC ACCCTACACTCTCAGCTGTGCGC CATTGGTT AGCTGGGAGTGGGGTGTTATGTTGACTGCCTTA	((((((((.((((((((((((((((((((((((((((.....))))))...)))))))).)))))).....	-40.3	1.09
Ljm-053-5p	CACCGTAGCAG CACGTAAATATTGGAGTGTGAACTCTGCGA TTCCAGTATTTCGTGCTGCTGCTGTGCGGTGGG((((((((((((((((((((((((((((((.....))))))...)))))))).)))))).....	-38.8	0.98
Ljm-057-5p	CCCACATGGT TTGGACCA GAT GACGCC ACATGGTCTCACA TGGTGCTGGACCAGATGACGTCACATGGTTCCACATGGTGTG GGA	(((((.((((.(((((((((((((((((((((((((.....))))...).))))).))))).)))))))).	-40	0.85
Ljm-058-5p	CGTGCA TTGTTAAAGTGCA GATAG TGGTAGTTGGT CTC TA AA AATGACAGCTACTCTATTTACACTTTAAACACTGTGCGG	((((.(.(.(((((((((((((((((((((((((((.....))))))...))))).))))).))))..))	-31.8	0.99
Ljm-061-3p	AGACAATACCTCAGAA TTGTCAGGGTGCTCAGCAATCCGCAC CTGACAGTGCTGGGGTTAGTCTCAGCAGAC	(((((...(((((((((((((((((((((((((((.....))))))...))..)))))).....	-31.5	0.83
Ljm-063-5p	TGCGCATCAG TCGGGCTGAACGGGGGGTT CGTG CACACAT CCATCTTG TAGCGAACGACCTACAGCGAACTGAGATA CTAC GGCGTG	.(((.((((.(...(((.(...(((((((((((((((.....))))...))))).))))).)))).....)))	-27.3	0.54
Ljm-065-5p	GGCTGTGCGAT GAGGTAGTAGTTGTATAGTT TTTTGGGTGC AATCCCAAACGGGTAACTGTACAATCTACTGTCTTCCACGG CTT	(((((.(.(.(.((((((((((((((((((((((((.....))))...)))))))).))))..))))))	-39.3	0.98
Ljm-066-3p	GCGCGATGCCTGCCGTTTCGATCCCCGTGCCGGGAAGCTTCTT CGGGA ACTGCACGTGGAGCGAAATGTTTGCGTCACGTCG	((((((((.(...((((((((((((((((((((((((.....))))...)))..))))))...))))))..))	-35.5	0.68
Ljm-072-5p	TTAGATCTT TGTTGGACCTGGATGAGACAGAGT ACTGAGA TCGGGTCTCTCTAAGCCCTCCACACGGTTTAT	.(((((((.(((.(.(.(((.(...((((((((((((.....))))...).))))).)))))))).	-27.1	0.75
Ljm-073-5p	GCGAGGGTGATGTAAACATCTCA ACTGGAAGCTGTGACGTC AGTAAAGCCTTTCAGTTAGGTGTTACGTCAGCACGCTAC	((((.(.(((((((((((((((((((((((((((.....))))))...)))))))).))))..))	-38.6	0.97

注 :miRNA 前体序列中加粗的部分为成熟序列 ;miRNA 前体序列的二级结构中 ,“.”表示颈环区碱基 ,“(”和“)”表示互补的碱基 ;Mfe 为最小折叠自由能 ,MfeI 为最小折叠自由能系数。

3 讨 论

miRNAs 是重要的基因表达调节因子,它们通过在转录后水平抑制特异的靶基因表达来行使功能。最近的研究表明,miRNA 在哺乳动物先天免疫和适应性免疫两大系统中具有独特的表达谱,在免疫细胞的发育和功能的调节中起关键作用^[34]。近年来,一种平行于脊椎动物适应性免疫系统的以可变淋巴受体为特征的适应性免疫系统在七鳃鳗中被发现^[35],拓宽了关于适应性免疫系统起源与进化的研究视野。目前,对无颌类免疫系统免疫应答机制方面的研究还不多见,尤其是关于七鳃鳗 miRNA 在免疫应答过程中的调控角色及其功能研究,在国内外尚未见报道。因此,开展七鳃鳗免疫组织中 miRNA 的基础研究将对未来探索 miRNA 在其免疫应答过程中的调控作用奠定基础。

高通量测序技术的兴起,大大降低了基因组学研究的时间和成本,同样为编码及非编码 RNA 的转录组学研究的快速发展提供了可能。本文通过对日本七鳃鳗单个核白细胞的 miRNA 进行测序,发现少数保守的 miRNA 家族(let-7、miR-146、miR-184、miR-143、miR-30、miR-142)在七鳃鳗免疫组织中呈现极高丰度表达。let-7 最早在线虫中被发现,能够调控细胞的分化和增殖的时序^[2];人 miR-146 可以调控干细胞的增殖和迁移^[36];miR-184 可调控神经细胞的发育与凋亡^[37];miR-143 与鼠胚胎干细胞向心脏祖细胞的分化调控有关^[38];miR-30 调节爪蟾前肾的发育过程^[39];miR-142 能够调节造血干细胞的分化^[40]。这些保守 miRNA 家族都具有调控细胞增殖和分化的功能,推测在七鳃鳗免疫系统免疫应答过程中,它们对免疫细胞的活化、分化、增殖的调控过程也应该起重要作用。

本文测序结果显示,除了物种间保守的 miRNA 家族外,尚发现七鳃鳗物种特异性 miRNA 的存在。对物种特异性 miRNA 的鉴定需要有实验数据的支持,因此本文采用高通量的定制芯片对候选的 70 个 miRNA 进行了检测。从芯片验证结果看,有 34 个候选的 miRNA 在免疫处理后的日本七鳃鳗单个核白细胞中的表达情况被有效检出,但有些 miRNA 的芯片检测信号强度与测序实验检测到的读数丰度不匹配(表 3)。Ljm-004、Ljm-016、Ljm-023、Ljm-049

及 Ljm-065 芯片检测信号较强,但测序读数丰度较低。另外,有些在测序检验时较高丰度表达的 miRNA(Ljm-026、Ljm-041 和 Ljm-044)在芯片检测时信号较低。究其原因可能和分别送到测序和芯片测试公司的总 RNA 样本在提取时间、提取的个体方面存在的差异所致。有研究认为,在高通量测序结果中,必须有 10 个拷贝以上的表达量(不含变体的表达量)来支持该小 RNA 的表达标准^[41]。但本研究发现,测序读数低于 10 的 8 种预测的物种特异的 miRNA 在利用定制芯片检测时都能被有效检测出来,并且 Ljm-016、Ljm-018、Ljm-023 和 Ljm-072 的检测信号强度均在 500 以上,说明 miRNA 表达具有时效性。尽管目前利用 qPCR 作为 miRNA 检测的工具具有准确、灵敏等优点,但定制芯片检测技术在通量和实验成本上无疑为物种特异性 miRNA 的验证提供了高效和快速的通道。

对所预测的 miRNA 的鉴定还要以其是否存在能折叠成较稳定的发卡结构的前体序列来确定。前体序列的预测一般需要该物种基因组数据的支持。由于目前还未进行日本七鳃鳗基因组的测序,本文曾尝试利用第二代测序技术获得的该物种白细胞转录组数据进行前体预测,许多新预测的 miRNA 也不能得到完全定位,分析原因可能是测序深度和覆盖度不够^[42]。由于海七鳃鳗为日本七鳃鳗近缘物种,序列一致性一般在 93% 以上,有些保守基因甚至能达到 100% 一致性^[45],因此本研究采用海七鳃鳗的基因组数据作为参考基因组进行特异性 miRNAs 的前体鉴定。从预测结果看,在所预测的物种特异性 miRNA 的前体序列中,有 16 个最小折叠自由能系数达到 0.85 以上,说明这 16 个物种特异性 miRNA 符合新 miRNA 鉴定标准^[46]。另外的 18 个候选 miRNA 的成熟 miRNA 可被芯片检测验证,但所预测的前体序列的最小折叠自由能系数均小于 0.85 这个阈值,可能是由于海七鳃鳗基因组数据的组装程度较低(覆盖率 80% 左右)而形成许多缺口,导致不能准确定位所致^[43]。

参考文献

- [1] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with anti-

- sense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993, 75(5): 843–854. [\[DOI\]](#)
- [2] Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2000, 403(6772): 901–906. [\[DOI\]](#)
- [3] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 2001, 294(5543): 853–858. [\[DOI\]](#)
- [4] Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 2001, 294(5543): 862–864. [\[DOI\]](#)
- [5] Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 2001, 294(5543): 858–862. [\[DOI\]](#)
- [6] Berezikov E, Plasterk RH. Camels and zebrafish, viruses and cancer: a microRNA update. *Hum Mol Genet*, 2005, 14(S2): R183–R190. [\[DOI\]](#)
- [7] Lai EC, Tomancak P, Williams RW, Rubin GM. Computational identification of *Drosophila* microRNA genes. *Genome Biol*, 2003, 4: R42. [\[DOI\]](#)
- [8] Berezikov E, Guryev V, van de Belt J, Wienholds E, Plasterk RH, Cuppen E. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell*, 2005, 120(1): 21–24. [\[DOI\]](#)
- [9] Lim LP, Glasner ME, Yekta S, Burge CB, Bartel DP. Vertebrate microRNA genes. *Science*, 2003, 299(5612): 1540. [\[DOI\]](#)
- [10] Lim LP, Lau NC, Weinstein EG, Abdelhakim A, Yekta S, Rhoades MW, Burge CB, Bartel DP. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev*, 2003, 17(8): 991–1008. [\[DOI\]](#)
- [11] Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, Barzilai A, Einat P, Einav U, Meiri E, Sharon E, Spector Y, Bentwich Z. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet*, 2005, 37(7): 766–770. [\[DOI\]](#)
- [12] Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP. MicroRNAs in plants. *Genes Dev*, 2002, 16(13): 1616–1626. [\[DOI\]](#)
- [13] Sunkar R, Zhu JK. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2004, 16(8): 2001–2019. [\[DOI\]](#)
- [14] Park W, Li JJ, Song RT, Messing J, Chen XM. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol*, 2002, 12(17): 1484–1495. [\[DOI\]](#)
- [15] Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, Sheridan R, Sander C, Grässer FA, van Dyk LF, Ho CK, Shuman S, Chien M, Russo JJ, Ju JY, Randall G, Lindenbach BD, Rice CM, Simon V, Ho DD, Zavolan M, Tuschl T. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods*, 2005, 2(4): 269–276. [\[DOI\]](#)
- [16] Pfeffer S, Zavolan M, Grässer FA, Chien M, Russo JJ, Ju JY, John B, Enright AJ, Marks D, Sander C, Tuschl T. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*, 2004, 304(5671): 734–736. [\[DOI\]](#)
- [17] Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miR-Base: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(S1): D154–D158. [\[DOI\]](#)
- [18] Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell*, 2003, 113(1): 25–36. [\[DOI\]](#)
- [19] Xu PZ, Vernooy SY, Guo M, Hay BA. The *Drosophila* microRNA mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr Biol*, 2003, 13(9): 790–795. [\[DOI\]](#)
- [20] Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*, 2004, 303(5654): 83–86. [\[DOI\]](#)
- [21] Park JK, Liu X, Strauss TJ, McKearin DM, Liu QH. The miRNA pathway intrinsically controls self-renewal of *Drosophila* germline stem cells. *Curr Biol*, 2007, 17(6): 533–538. [\[DOI\]](#)
- [22] Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development*, 2005, 132(21): 4653–4662. [\[DOI\]](#)
- [23] Ruby JG, Jan C, Player C, Axtell MJ, Lee W, Nusbaum C, Ge H, Bartel DP. Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans*. *Cell*, 2006, 127(6): 1193–1207. [\[DOI\]](#)
- [24] Ruby JG, Stark A, Johnston WK, Kellis M, Bartel DP, Lai EC. Evolution, biogenesis, expression, and target predictions of a substantially expanded set of *Drosophila* microRNAs. *Genome Res*, 2007, 17(12): 1850–1864. [\[DOI\]](#)
- [25] Fahlgren N, Howell MD, Kasschau KD, Chapman EJ, Sullivan CM, Cumbie JS, Givan SA, Law TF, Grant SR, Dangel JL, Carrington JC. High-throughput sequencing of *Arabidopsis* microRNAs: evidence for frequent birth and death of MIRNA genes. *PLoS One*, 2007, 2(2): e219. [\[DOI\]](#)
- [26] Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Ara-

- vin A, Pfeffer S, Rice A, Kamphorst AO, Landthaler M, Lin C, Socci ND, Hermida L, Fulci V, Chiaretti S, Foà R, Schliwka J, Fuchs U, Novosel A, Müller RU, Schermer B, Bissels U, Inman J, Phan Q, Chien M, Weir DB, Choksi R, De Vita G, Frezzetti D, Trompeter HI, Hornung V, Teng G, Hartmann G, Palkovits M, Di Lauro R, Wernet P, Macino G, Rogler CE, Nagle JW, Ju JY, Papavasiliou FN, Benzing T, Lichter P, Tam W, Brownstein MJ, Bosio A, Borkhardt A, Russo JJ, Sander C, Zavolan M, Tuschl T. A mammalian microRNA expression Atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*, 2007, 129(7): 1401–1414. [\[DOI\]](#)
- [27] Janvier P. Palaeontology: modern look for ancient lamprey. *Nature*, 2006, 443(7114): 921–924. [\[DOI\]](#)
- [28] Heimberg AM, Cowper-Sal-lari R, Sémon M, Donoghue PC, Peterson KJ. microRNAs reveal the interrelationships of hagfish, lampreys, and gnathostomes and the nature of the ancestral vertebrate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(45): 19379–19383. [\[DOI\]](#)
- [29] 刘岑杰, 刘欣, 吴毓, 马飞, 王继红, 李庆伟. 日本七鳃鳗类淋巴细胞的分离及细胞学特征. *动物学杂志*, 2008, 43(1): 82–87. [\[DOI\]](#)
- [30] Shu LF, Hu ZL. Characterization and differential expression of microRNAs elicited by sulfur deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *BMC Genom*, 2012, 13: 108. [\[DOI\]](#)
- [31] Zhang BH, Pan XP, Cox B. Evidence that miRNAs are different from other RNAs. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63(2): 246–254. [\[DOI\]](#)
- [32] Gao XL, Gulari E, Zhou XC. In situ synthesis of oligonucleotide microarrays. *Biopolymers*, 2004, 73(5): 579–596. [\[DOI\]](#)
- [33] Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*, 2003, 19(2): 185–193. [\[DOI\]](#)
- [34] O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(2): 111–122. [\[DOI\]](#)
- [35] Pancer Z, Amemiya CT, Ehrhardt GR, Ceitlin J, Gartland GL, Cooper MD. Somatic diversification of variable lymphocyte receptors in the agnathan sea lamprey. *Nature*, 2004, 430(6996): 174–180. [\[DOI\]](#)
- [36] Hsieh JY, Huang TS, Cheng SM, Lin WS, Tsai TN, Lee OK, Wang HW. MiR-146a-5p circuitry uncouples cell proliferation and migration, but not differentiation, in human mesenchymal stem cells. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(21): 9753–9763. [\[DOI\]](#)
- [37] Li P, Peng JJ, Hu JB, Xu ZX, Xie W, Yuan LD. Localized expression pattern of miR-184 in *Drosophila*. *Mol Biol Rep*, 2010, 38(1): 355–358. [\[DOI\]](#)
- [38] Cordes KR, Sheehy NT, White MP, Berry EC, Morton SU, Muth AN, Lee TH, Miano JM, Ivey KN, Srivastava D. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature*, 2009, 460(7256): 705–710. [\[DOI\]](#)
- [39] Agrawal R, Tran U, Wessely O. The miR-30 miRNA family regulates *Xenopus pronephros* development and targets the transcription factor *Xlim1/Lhx1*. *Development*, 2009, 136(23): 3927–3936. [\[DOI\]](#)
- [40] Lu XY, Li XJ, He QP, Gao J, Gao Y, Liu B, Liu F. miR-142-3p regulates the formation and differentiation of hematopoietic stem cells in vertebrates. *Cell Research*, 2013, 23(12): 1356–1368. [\[DOI\]](#)
- [41] 高飞, 孙鹏, 陈静, 李章磊, 张孜宸, 李华云, 王宁, 周宜君. 蒙古沙冬青保守 microRNAs 的鉴定及靶基因预测. *遗传*, 2014, 36(5): 485–494. [\[DOI\]](#)
- [42] Zhu LN, Dai YL, Ma F, Li QW. ESTs analyses of *Lamprologus japonica* liver and comparison transcriptome with the jawed vertebrates. *Sci China Ser C(Life Sci)*, 2008, 51(1): 27–37. [\[DOI\]](#)
- [43] Smith JJ, Kuraku S, Holt C, Sauka-Spengler T, Jiang N, Campbell MS, Yandell MD, Manousaki T, Meyer A, Bloom OE, Morgan JR, Buxbaum JD, Sachidanandam R, Sims C, Garruss AS, Cook M, Krumlauf R, Wiedemann LM, Sower SA, Decatur WA, Hall JA, Amemiya CT, Saha NR, Buckley KM, Rast JP, Das S, Hirano M, McCurley N, Guo P, Rohner N, Tabin CJ, Piccinelli P, Elgar G, Ruffier M, Aken BL, Searle SM, Muffato M, Pignatelli M, Herretero J, Jones M, Brown CT, Chung-Davidson YW, Nanlohy KG, Libants SV, Yeh CY, McCauley DW, Langeland JA, Pancer Z, Frittsch B, de Jong PJ, Zhu BL, Fulton LL, Theising B, Flicek P, Bronner ME, Warren WC, Clifton SW, Wilson RK, Li WM. Sequencing of the sea lamprey (*Petromyzon marinus*) genome provides insights into vertebrate evolution. *Nat Genet*, 2013, 45(4): 415–421. [\[DOI\]](#)

(责任编辑: 胡松年)