

文章编号: 1674-5566(2012)03-0344-07

Let-7d 在牙鲆变态发育期间的表达及靶基因预测

吴明林, 施志仪, 付元帅, 张俊玲

(上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: MicroRNAs (miRNAs) 通过抑制编码基因的转录调控关键的生物学进程。研究发现, *let-7* 是时序发育过程中的重要调控因子, 在促进幼体向成体转变的发育过程中起着极其重要的作用。利用 Solexa 测序技术从牙鲆中成功鉴定出 *let-7* 家族的 10 个成员 (*let-7a*, *let-7b*, *let-7c*, *let-7d*, *let-7e*, *let-7f*, *let-7g*, *let-7h*, *let-7i*, *let-7j*)。相对于 *let-7* 家族其他成员, *let-7d* 的拷贝数最多, 推测其在牙鲆发育过程中扮演着更重要的角色。运用实时荧光定量 PCR 方法分析 *let-7d* 在牙鲆变态发育不同时期的表达, 结果发现, 在对照组和甲状腺激素处理组, *let-7d* 的表达模式类似: 前 5 个时期 (孵化后 17 d, 17 dph; 变态 I 期, 20 dph; 变态 II 期, 23 dph; 变态 III 期, 29 dph; 变态 IV 期, 36 dph) 表达量逐渐上升; 变态晚期 (36 dph) 达到高峰; 变态结束 (41 dph) 表达量呈现下降的趋势。定量结果显示, 甲状腺激素下调 *let-7d* 的表达, 与对照组呈显著性差异 ($P < 0.05$)。对牙鲆不同组织中 *let-7d* 的表达情况分析表明, *let-7d* 主要存在于牙鲆的头部 (脑, 鳃, 心脏)。靶基因预测发现, 在目前已公布的 482 条牙鲆 mRNA 序列中, 其中有 30 条 mRNA 的 3' 非翻译区 (3'-UTRs) 存在 *let-7d* 结合位点。这些预测的靶基因涉及到发育过程的许多方面: 蛋白折叠, 细胞分化, 信号转导, 病毒免疫反应和信号通路等。这些结果说明, *let-7d* 在调控牙鲆从仔鱼向稚鱼转变的变态发育过程中起着极其重要的作用。

研究亮点: 首次从 *let-7d* miRNA 的角度探究牙鲆变态发育。*let-7d* 的表达量在变态晚期 (孵化后 36 d) 达到高峰, 调控牙鲆变态发育进程。甲状腺激素下调 *let-7d* 的表达, 促进牙鲆从仔鱼向稚鱼的转变。*let-7d* 在所有检测的组织中均有表达, 但其表达量主要集中在头部 (鳃、心脏、脑)。

关键词: *let-7d*; 牙鲆; 变态; 甲状腺激素; 靶基因

中图分类号: S 917

文献标志码: A

MicroRNAs (miRNAs) 是一类内源性的具有调控功能的非编码小分子 RNA, 长约 22 个核苷酸, 在转录后水平调控基因的表达。成熟的 miRNAs 是由前体经过一系列核酸酶剪切加工而形成, 随后组装进 RNA 诱导的沉默复合体, 通过碱基互补配对的方式作用于靶 mRNA, 根据互补程度的不同降解靶 mRNA 或抑制靶 mRNA 的翻译^[1-4]。MiRNAs 在生物体内的多样化调控途径中扮演着关键性角色, 包括控制发育进程、细胞分化、细胞分裂、细胞凋亡以及器官的发育等^[4-6]。探究 miRNAs 功能最大的挑战是识别他们各自的靶基因。MiRNAs 种子区序列 (从 5' 端

开始的 2-8 位) 是识别靶 mRNA 最重要的区域, 在靶基因识别过程中扮演着极其重要的角色^[7]。

Let-7 家族 miRNAs 是生物发育的关键调控因子, 在促进幼体向成体转变的发育过程中起着极其重要的作用。研究表明, *let-7* miRNA 在胚胎发育早期阶段并未表达, 但在器官形成和组织分化时其表达量急剧上升, 例如: *let-7* 在线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 幼虫末期, 斑马鱼孵化后 48 h, 环节动物和软体动物的成年阶段高度表达^[8]。对果蝇的研究也发现, *let-7* 在果蝇变态发育开始时表达, 是果蝇从幼虫向成虫转变主要的时序调控基因^[9]。可见 *let-7* 控制着动物的后期

收稿日期: 2011-12-11 修回日期: 2011-12-24

基金项目: 国家自然科学基金 (31172392); 上海市重点学科建设项目 (S30701)

作者简介: 吴明林 (1986—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物分子遗传学。E-mail: flyinghu2008@yahoo.com.cn

通讯作者: 施志仪, E-mail: zyshi@shou.edu.cn

发育过程,是动物时序性发育的关键性调控因子,主要功能表现为调控生物从幼体向成体转变的时序发育。牙鲆在其早期发育史经历一个从仔鱼向稚鱼转变的变态发育过程。然而,关于 *let-7* miRNA 在牙鲆从幼体向成体转变的时序发育中的作用未见文献报道。本研究重点探讨牙鲆变态发育期间 *let-7d* 表达模式,同时通过添加外源性甲状腺激素,研究激素对 *let-7d* 表达水平的影响,进而探究 *let-7d* 对牙鲆变态发育的影响,以及 *let-7d* 是否同样具有促进牙鲆从仔鱼向稚鱼转变的时序调控作用。

1 材料与方法

1.1 实验样品收集及 RNA 提取

实验用的仔鱼取自中国水产科学研究院北戴河中心实验站。实验牙鲆分为 2 组,正常对照组和甲状腺激素处理组,甲状腺激素处理组终浓度为 0.1 mg/L。变态期牙鲆被分成 6 个阶段:孵化后 17 天(17 dph)还未变态的仔鱼;变态 I 期(20 dph),右眼刚刚开始移动;变态 II 期(23 dph),右眼已经明显向仔鱼背部边缘迁移,但在左侧并不可见;变态 III 期(29 dph),右眼在仔鱼身体左侧变得可见,但还未到达背部中线;变态 IV 期(36 dph),右眼到达背部中线;变态 V 期(41 dph),右眼穿过头顶到达身体左侧,变态结束^[10-12]。

用 TRIzol 法提取牙鲆 6 个变态时期以及成

鱼 10 个组织(鳃、心脏、胃、脾脏、肝脏、肠、脑、肌肉、肾、生殖腺)中的总 RNA,每个样品设 3 个重复,抽提的总 RNA 经 DNA 酶(大连宝生物工程有限公司)处理后用分光光度计检测其 OD 值,1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,利用茎环结构引物反转录合成 cDNA^[13](表 1)。

1.2 Solexa 测序

将牙鲆变态发育 6 个时期的 RNA 混合,制成 RNA 混合样本,用 15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离纯化 14~30 个碱基的小分子 RNA 片段,在纯化的小片段末端加上 5' 接头,再用 15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离纯化含 5' 接头的产物,约 40~60 个碱基的小分子片段。随后在含 5' 接头的产物上加上 3' 接头,其总长度达到 70~90 个碱基。用 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离纯化 70~90 个碱基的 RNA 片段,反转录后进行 PCR 扩增,制成 cDNA 文库。纯化的 cDNA 直接用于测序分析(杭州联川生物信息技术有限公司)。

1.3 实时荧光定量 PCR

样品 cDNA 进行 10 倍稀释,以稀释后的 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR。反应体系为:SYBR Premix Ex Taq(2×) 10 μL、cDNA 模板 2 μL、10 μmol/L 上下游引物各 0.4 μL,加 ddH₂O 至 20 μL。采用两步法 PCR 扩增标准程序,循环参数为 95 °C 预变性 10 s,95 °C 变性 10 s,60 °C 退火 30 s,共 40 个循环。以 5S rRNA 为内参基因,对定量结果进行分析。

表 1 PCR 扩增引物

Tab. 1 Primers used in this study for PCR amplification assay

引物	核苷酸序列(5'-3')
<i>let-7d</i> RT Primer	CTCAACTGGTGTCTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAACCATAC
<i>let-7d</i> -F	ACACTCCAGCTGGGTGAGGTAGTTGTTGT
<i>let-7d</i> -R	AACTGGTGTCTCGTGGAG
5S rRNA-F	CCATACCACCCTGAACAC
5S rRNA-R	CGGTCTCCCATCCAAGTA

1.4 靶基因预测

美国国立生物技术信息中心(NCBI)数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>)中收录的牙鲆 mRNA 为 482 个。以 MiRanda^[14]和 RNAhybrid^[15-16]软件相结合的方法预测这些 mRNA 的 3' 非翻译区是否存在与 *let-7d* 的结合位点。为提高数据的可靠性,预测时的最小自由能

(MFE)设置为 -87.9 kJ/mol,自由能越低代表 *let-7d* 与 mRNA 之间结合越紧密。

1.5 数据统计

采用 SPSS 13.0 进行单因素方差分析,用软件中 Duncan 多重比较法分析 *let-7d* 在不同发育时期以及不同组织中的相对表达,当 $P < 0.05$ 时差异显著。

2 结果

2.1 *let-7d* 家族 miRNAs

以 *let-7* 家族 miRNAs 种子区序列 (5'-GAGGUAG-3') 为基础,对 Solexa 测序结果进行分析。在牙鲆中共发现了 10 个保守的 *let-7* 家族 miRNAs (*let-7a*, *let-7b*, *let-7c*, *let-7d*, *let-7e*, *let-7f*, *let-7g*, *let-7h*, *let-7i*, *let-7j*, 图 1)。比对分析发现 *let-7* 家族 miRNAs 保守性主要存在于 5' 端 (图 1)。

```

let-7a UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
let-7b UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
let-7c UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGGUU
let-7d UGAGGUAGUUUGGUUGUAUAGGUU
let-7e UGAGGUAGUAGAUUGAAUAGUU
let-7f UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU
let-7g UGAGGUAGUAGUUUGUAUAGUU
let-7h UGAGGUAGUAGUUUGUGUUUUU
let-7i UGAGGUAGUAGUUUGUGCUUUU
let-7j UGAGGUAGUUUGUUUGUACAGUU
          ****          ***          ****
    
```

图 1 牙鲆 *let-7d* 家族成员 (*let-7a* ~ *j*)

Fig. 1 The members of the *let-7d* family miRNAs

* 代表序列的保守性。

Solexa 测序方法不仅能识别 miRNAs,还能检测到相关 miRNAs 的拷贝数。分析测序结果发现,*let-7a*, *let-7b*, *let-7c*, *let-7d* 的拷贝数明显大于该家族其他几个 miRNAs (*let-7e*, *let-7f*, *let-7g*, *let-7h*, *let-7i*, *let-7j*),其中 *let-7d* 的拷贝数远远超过其他成员。*let-7a*, *let-7b* 和 *let-7c* 的拷贝数分别是 *let-7d* 的 31%, 15% 和 26%,其他成员都低于 5% (图 2)。

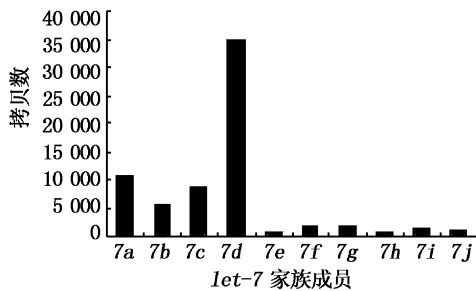


图 2 牙鲆 *let-7d* 家族 miRNAs 拷贝数

Fig. 2 The copy numbers of the *let-7d* family miRNAs

2.2 *let-7d* 在牙鲆变态发育期间的表达

实时荧光定量 PCR 用于检测 *let-7d* 在变态

发育各阶段的表达水平。数据分析表明,在变态发育最初两个阶段 (17 dph, 20 dph),*let-7d* 表达量较低,随后表达量渐渐上升,在变态晚期 (36 dph) 达到顶峰,变态结束 (41 dph),其表达量下降 (图 3)。在变态开始之前 (17 dph),*let-7d* 的表达量仅是 36 dph 的 27%,在 29 dph,*let-7d* 表达量接近最高峰的 50%,变态末期 (41 dph) 下降到 72%。在变态晚期 (36 dph), *let-7d* 表达水平与其他各时期存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

通过添加外源性甲状腺激素诱导牙鲆变态,研究甲状腺激素对 *let-7d* 表达的影响。甲状腺激素处理后,牙鲆中 *let-7d* 的表达模式跟正常组类似:在起初两个阶段 (17 dph, 20 dph) 其表达量较低,随后上升,同样在 36 dph 达到高峰,随后又有下降的趋势 (图 3)。甲状腺激素处理组变态晚期 (36 dph),*let-7d* 表达量也与其他各阶段存在差异表达 ($P < 0.05$)。

分析数据发现,相对于正常组,甲状腺激素处理后的牙鲆 *let-7d* 的表达量明显下降。在变态发育的每一个时间点,甲状腺激素处理的表达量均低于正常组的 50% ($P < 0.05$, 图 3)。在每一个检测的时间点,甲状腺激素处理组 *let-7d* 的表达量分别为正常组的 22%, 24%, 47%, 47%, 49%, 23%。可见,甲状腺激素抑制了 *let-7d* 的表达。

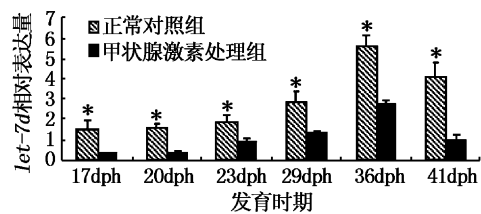


图 3 *let-7d* 在牙鲆变态发育不同时期的表达情况

Fig. 3 Relative expression of *let-7d* at different development stages of *Paralichthys olivaceus* metamorphosis

2.3 *let-7d* 在组织中的表达

荧光定量 PCR 技术分析 *let-7d* 在鳃、心脏、胃、脾脏、肝脏、肠、脑、肌肉、肾、生殖腺中的表达情况。数据表明,*let-7d* 存在于牙鲆的所有检测的组织中,其中脑、心脏、鳃中的表达量明显高于其他各组织。心脏、鳃中 *let-7d* 的表达量也仅为脑中的 17% 和 11%,*let-7d* 在其他组织的表达量

不足脑中的 5%,与脑中 *let-7d* 的表达水平呈显著差异 ($P < 0.05$,图 4)。

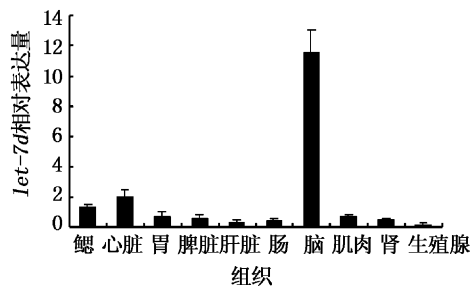


图 4 *let-7d* 在各组织的表达(鳃、心脏、胃、脾脏、肝脏、肠、脑、肌肉、肾、生殖腺)

Fig. 4 The relative expression levels of *let-7d* in various tissues (gill, heart, stomach, spleen, liver, intestine, brain, muscle, kidney and testicle)

2.4 *let-7d* 靶基因预测

将 *let-7d* 与牙鲆 mRNA 3'-UTRs 序列进行比对,预测到 30 个 mRNA 的 3'-UTRs 序列存在 *let-7d* 的结合位点,这 30 个可能的 *let-7* 靶基因属于不同的基因家族,它们编码的蛋白质涉及到不同的生物学功能,包括免疫应答、蛋白合成、骨骼发

育、转录调控、信号转导、肌肉发育和细胞周期调控等(表 2)。

3 讨论

Let-7 家族 miRNAs 是生物发育的关键调控因子,在不同的生物间具有高度的保守性。然而不同生物间,*let-7* 家族 miRNAs 成员数是不同的,斑马鱼有 11 个 *let-7* 家族成员,在线虫中,*let-7* 家族成员有 4 个(*let-7*, *mir-48*, *mir-84*, *mir-241*)^[17],而果蝇仅有一个(*let-7*)。由于成员间共享种子区序列,同一个 miRNA 家族的不同成员可能调控同一个靶基因,增加了调控网络的复杂性。Solexa 测序方法被用于识别牙鲆变态发育过程中的 miRNAs,用这个高通量的测序方法,鉴定出 10 个 *let-7* 家族成员(*let-7a*, *let-7b*, *let-7c*, *let-7d*, *let-7e*, *let-7f*, *let-7g*, *let-7h*, *let-7i*, *let-7j*,图 1)。*Let-7* 家族成员共享种子区序列(5'-GAGGUAG-3')。不同成员间除种子区以外的序列存在稍许的差异(图 1),成员间序列的相似性,为研究各自成员的功能提供了新的挑战。

表 2 *let-7d* 靶基因预测
Tab. 2 Predicted target genes of *let-7d*

基因	登录号	功能	最小自由能/(kJ/mol)
Syntenin	GU808360.1	细胞内信号转导	-96.3
Decorin	AY608584.1	器官形成	-103.8
HSP70	AF053059.1	蛋白折叠	-97.1
IRF7	GU017419.1	病毒免疫反应	-99.7
VDAC	DQ821474.1	阴离子运输	-109.7
B2m	AF433657.1	免疫反应	-96.3
IGF-1	AF061278.1	骨骼发育	-106.3
SroTP	GU186842.1	离子运输	-108.0
Hsp40B11	DQ199619.1	蛋白折叠	-119.3
GDF15	AB468972.1	信号转导	-88.3
Rxra	FJ262992.1	转录	-94.2
Pld2	EU872185.1	细胞骨架	-107.2
Thymosin beta	EU586110.1	细胞周期调控	-98.8
Dio3	AB362423.1	激素生物合成	110.1
Creatine kinase 1	EU024928.1	肌肉收缩	-109.7
TRP2	EU007656.1	蛋白水解	-89.6
Hsc71	DQ662231.1	蛋白折叠	-97.1
CCR3	AB081311.1	细胞防御	-93.8
TNFR-1	AB080946.1	细胞凋亡	-91.7
IL-1b	AB070835.1	免疫反应	-89.2
Hsp60	DQ250130.1	蛋白折叠	-98.4
Spaw	AB232903.1	左右不对称	-90.9
COL1A2	AB196514.1	骨骼发育	-103.0
HRI	DQ193596.1	防御反应	-93.4
Granzyme III-2	AB191199.1	细胞凋亡	-90.0
Era	AB070629.1	转录	90.9
Pitx2	AB050722.1	左右不对称	-90.9
Ctfr	AB035315.1	骨骼发育	-99.7
Peptide Y	AB055213.1	细胞信号转导	-120.6

注:最小自由能(MFE)设置为 -87.9 kJ/mol,自由能越低代表 *let-7d* 与 mRNA 之间结合越紧密。

对线虫的研究发现,*let-7* 家族成员:*mir-48*,*mir-84* 和 *mir-241*, 通过作用于各自的靶基因 *lin-28* 和 *lin-46*, 调控线虫从 L2 期到 L3 期的转变^[18]。最近对果蝇的研究发现,*let-7* 控制幼体向成体(L/A)的转变^[9]。这些研究表明 *let-7* 家族控制着生物的时序发育, 促进生物向成体的过渡。但迄今为止,*let-7* 家族在牙鲆变态过程中的研究还未见报道。

Solexa 测序结果发现, 牙鲆 *let-7* 家族的 10 个成员中,*let-7d* 的拷贝数最高, 该家族其他成员的拷贝数均低于 *let-7d* 表达量的 26%, 存在显著性差异($P < 0.05$, 图 2)。因此, 我们推测, 在牙鲆 *let-7* 家族的 10 个成员中,*let-7d* 在促进牙鲆从仔鱼向稚鱼转变的时序发育过程中扮演着更重要的角色。

定量数据分析表明,*let-7d* 的表达量随着牙鲆变态发育的进程逐渐增强, 在变态晚期(36 dph)表达量达到顶峰, 在变态结束后(41 dph), 表达量呈现下降的趋势(图 3)。对果蝇、线虫、软体动物等研究发现,*let-7* 表达水平在生物发育的末期逐渐积累到最大值, 促进生物从幼虫向成虫的转变^[19]。进一步研究发现, 发育末期急剧上调的 *let-7* 通过抑制促进幼体细胞分化的关键异时性蛋白的表达, 从而促进向成体的转变^[20-21]。可见, 在牙鲆变态过程中,*let-7d* 的表达模式与其他已研究的生物相似, 表明进化过程中 *let-7* 家族调控网络进化的保守性。考虑到 *let-7* 家族进化过程中的保守性, 在牙鲆变态过程中,*let-7d* 同样促进了牙鲆从仔鱼向稚鱼转变的变态发育过程。

甲状腺激素加速牙鲆从仔鱼到稚鱼的变态发育过程, 目前认为甲状腺激素产生的生物作用是通过甲状腺激素受体(TRs)介导的^[22-24]。甲状腺激素进入细胞核后与受体结合, 改变受体的构象, 从而激活受体, 并使之结合于基因的一段特定的 DNA 序列, 从而正向或反向调节目的基因的转录和表达^[25]。甲状腺激素处理后, 相对于正常对照组, 牙鲆中 *let-7d* 表达量发生显著的变化, 其表达量明显地降低($P < 0.05$), 但有趣的是,*let-7d* 的表达趋势未发生任何变化, 其表达规律跟正常组相类似(逐渐升高, 在 36 dph 达到高峰, 随后下降)。数据分析表明, 甲状腺激素对 *let-7d* 有一定的调控作用, 下调了 *let-7d* 的表达, 但未改变 *let-7d* 的表达模式。对比正常对照组与

甲状腺激素组数据, 推断存在如下调控模式: 外源性甲状腺激素进入体内与甲状腺激素受体结合, 改变甲状腺激素受体的构象, 使之激活, 激活的甲状腺激素受体作用于细胞核内的特定 DNA 片段上, 负调控 *let-7d* 基因的转录, 从而下调 *let-7d* 的表达, 其中具体的调控分子机制有待进一步的研究。

在牙鲆变态过程中, 各组织发生形态和功能的变化, 以适应新的生活习性。最重要也是最明显的变化是其右眼移到身体左侧, 鱼体由侧卧转变为平卧, 很明显头部相对于鱼体其他部位发生更急剧的变化, 任何形态学的改变必然伴随着基因调控水平的变化。本实验研究 *let-7d* 在各个组织的差异表达, 以期探究其对牙鲆组织的调控模式。定量数据分析表明,*let-7d* 在所有检测的组织中均表达, 但表达量主要集中在头部(脑, 心脏, 鳃), 尤其在脑部, 暗示 *let-7d* 在头部的发育过程中起着更重要的作用。头部这 3 个组织(脑, 心脏, 鳃)是牙鲆生存的核心组织, 任何微小的变化都可能导致牙鲆在变态过程中的死亡。在变态发育过程中, 必然有一种机制确保头部这 3 个组织形态上的稳定性, 降低变态对头部的伤害。MiRNA 具有下调靶基因的作用, 在牙鲆变态过程中, 高度表达的 *let-7d* 可能下调相关基因的表达, 尤其是左右不对称基因, 以维持组织的形态稳定性, 尤其脑的形态稳定性。

MiRNAs 靶基因的识别, 对探究 miRNAs 的功能起着决定性的作用, 每一个 miRNAs 可能有数百个靶基因^[26]。这 30 个可能的 *let-7d* 靶基因属于不同的基因家族(表 2), 它们可能参与生长发育、细胞分化、信号转导、病毒免疫等生物过程。左右不对称发育基因 *Pitx2* 和 *Shh* 的 3'-UTRs 存在 *let-7d* 的结合位点, 使研究 *let-7d* 在牙鲆左右不对称变态发育中的作用变得更有价值。*Pitx2* 是调节内脏器官左右不对称的中心效应子; *Shh* 是沿整个左右轴建立不对称性信号级联中的关键成分, 异位表达的 *Shh* 诱导 *Nodal* 和 *Pitx2* 异位表达在右侧板中胚层, 结果会导致内脏器官逆位。另外还有骨骼发育相关基因 *COL1A1*, *IGF-I*, 器官形成有关基因 *Decorin* 等。*let-7d* 靶标的广泛表达表明 *let-7d* 参加多样的生物学进程, 靶基因研究为牙鲆变态过程的生物学研究提供了新思路。

本研究首次通过 Solexa 测序,检测到牙鲆中存在 *let-7* 家族的 10 个成员,从 *let-7a* 到 *let-7j*。通过实时荧光定量 PCR,重点分析了 *let-7d* 在正常对照组和甲状腺激素处理组的表达情况,均发现其在变态晚期达到最高,促进了牙鲆从仔鱼向稚鱼转变的变态发育过程。随后对各组织 *let-7d* 表达情况分析发现,其在头部的表达量最高,在维持头部形态方面起着一定的作用。靶基因预测发现,*let-7* 通过作用于不同的基因,调控多样的生物学过程。本研究为后续进一步探究 *let-7d* 的功能奠定基础。

参考文献:

- [1] CAI X, HAGEDORN C H, CULLEN B R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs[J]. RNA, 2004, 10: 1957 - 1966.
- [2] CARTHEW R W, SONTHEIMER E J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs[J]. Cell, 2009, 136: 642 - 655.
- [3] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116: 281 - 297.
- [4] KLOOSTERMAN W P, PLASTERK R H. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease [J]. Developmental Cell, 2006, 11: 441 - 450.
- [5] BUSHATI N, COHEN S M. MicroRNA functions[J]. Cell and Developmental Biology, 2007, 23: 175 - 205.
- [6] CHONG M M, ZHANG G, CHELOUFI S, et al. Canonical and alternate functions of the microRNA biogenesis machinery[J]. Genes Development, 2010, 24: 1951 - 1960.
- [7] BRENNER J, STARK A, RUSSELL R B, et al. Principles of microRNA-target recognition[J]. PLoS Biology, 2005, 3: e85.
- [8] CAYGILL E E, JOHNSTON L A. Temporal regulation of metamorphic processes in *Drosophila* by the *let-7* and miR-125 heterochronic microRNAs[J]. Current Biology, 2008, 18: 943 - 950.
- [9] SOKOL N S, XU P, JAN Y N, et al. *Drosophila let-7* microRNA is required for remodeling of the neuromusculature during metamorphosis[J]. Genes Development, 2008, 22: 1591 - 1596.
- [10] MINAMI T. The early life history of a flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 1982, 48: 1581 - 1588.
- [11] 张俊玲, 施志仪. 牙鲆早期阶段的变态发育及其机制[J]. 上海水产大学学报, 2003, 12(4): 348 - 352.
- [12] OKADA N, TAKAGI Y, SEIKAI T, et al. Asymmetrical development of bones and soft tissues during eye migration of metamorphosing Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. Cell and Tissue Research, 2001, 304: 59 - 66.
- [13] CHEN C, RIDZON D A, BROOMER A J, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR [J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33: e179.
- [14] JOHN B, ENRIGHT A J, ARAVIN A, et al. Human MicroRNA targets[J]. PLoS Biology, 2004, 2: e363.
- [15] REHMAMEIER M, STEFFEN P, HOCHSMANN M, et al. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes [J]. RNA, 2004, 10: 1507 - 1517.
- [16] TANI S, KUSAKABE R, NARUSE K, et al. Genomic organization and embryonic expression of *miR-430* in medaka (*Oryzias latipes*): insights into the post-transcriptional gene regulation in early development[J]. Gene, 2010, 449: 41 - 49.
- [17] LIM L P, LAU N C, WEINSTEIN E G, et al. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*[J]. Genes Development, 2003, 17: 991 - 1008.
- [18] ABBOTT A L, ALVAREZ-SAAVEDRA E, MISKA E A, et al. The *let-7* MicroRNA family members mir-48, mir-84, and mir-241 function together to regulate developmental timing in *Caenorhabditis elegans* [J]. Developmental Cell, 2005, 9: 403 - 414.
- [19] PASQUINELLI A E, REINHART B J, SLACK F, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA[J]. Nature, 2000, 408: 86 - 89.
- [20] ROUGVIE A E. Intrinsic and extrinsic regulators of developmental timing: from miRNAs to nutritional cues [J]. Development, 2005, 132: 3787 - 3798.
- [21] MOSS E G. Heterochronic genes and the nature of developmental time[J]. Current Biology, 2007, 17: R425 - 434.
- [22] SCHREIBER A M. Asymmetric craniofacial remodeling and lateralized behavior in larval flatfish [J]. The Journal of Experimental Biology, 2006, 209: 610 - 621.
- [23] INUI Y, YAMANO K, MIWA S. The role of thyroid hormone in tissue development in metamorphosing flounder [J]. Aquaculture, 1995, 135: 87 - 98.
- [24] 鲍宝龙, 张臻宇, 龚小玲, 等. 外源甲状腺激素及可的松对牙鲆早期发育阶段生长、发育和变态的影响[J]. 上海水产大学学报, 1999, 8(3): 242 - 245.
- [25] BUCHHOLZ D R, PAUL B D, FU L, et al. Molecular and developmental analyses of thyroid hormone receptor function in *Xenopus laevis*, the African clawed frog[J]. General and Comparative Endocrinology, 2006, 145: 1 - 19.
- [26] GRIMSON A, FARH K K, JOHNSTON W K, et al. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing[J]. Molecular Cell, 2007, 27: 91 - 105.

Expression character and target predictions of *let-7d* during metamorphosis in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)

WU Ming-lin, SHI Zhi-yi, FU Yuan-shuai, ZHANG Jun-ling

(College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Recent work has demonstrated that microRNAs (miRNAs) are involved in critical biological processes by suppressing the translation of coding genes. *let-7* is a critical regulator of developmental timing events at the larval-to-adult transition. MiRNAs in *Paralichthys olivaceus* were identified by Solexa sequencing. Ten miRNAs belonged to the *let-7* family (from *let-7a* to *let-7j*). The copy numbers of *let-7d* were significantly higher than the other members of the *let-7* family. Quantitative analysis revealed that the expression levels of *let-7d* in the normal control group and the thyroid hormones (THs) treatment group had a common characteristic: expression gradually increased to a peak level, and then decreased to a low level. *Let-7d* levels in the THs treatment group were 50% less than those of the normal control group at each stage of development ($P < 0.05$). *Let-7d* was detected in all tissues examined, whereas at relatively higher levels in gill, heart and brain. Data of target predictions indicated that the 3'-untranslated regions (3'-UTRs) of 30 registered mRNAs had target sites matched with *let-7d*. These genes were grouped into families: protein fold, cell proliferation, signal transduction, virus immune response and signaling path-ways. The results of the present study suggested that *let-7d* played an essential role in regulating the developmental events during metamorphosis in *Paralichthys olivaceus*.

Key words: *let-7d*; *Paralichthys olivaceus*; metamorphosis; thyroid hormones; target genes