

文章编号: 1674-5566(2017)01-0001-07

DOI:10.12024/jsou.20160301705

反义抑制 miR-202 引起斑马鱼早期胚胎发育异常研究

许彦娜¹, 韩兵社^{1,2}, 郑英慧³, 戴中华³, 陈良标^{1,2}

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 3. 中国科学院 遗传与发育生物学研究所, 北京 100101)

摘要: 为了探讨 miR-202 在鱼类胚胎发育中的功能, 采用实时定量反转录 PCR 技术和整体原位杂交技术检测了 miR-202 在斑马鱼胚胎发育阶段的表达。结果发现 miR-202 是母源性分子并在斑马鱼胚胎发育过程中持续表达, 尤其在早期胚胎发育阶段表达水平较高。在此基础上, 采用基因沉默技术在斑马鱼受精卵中显微注射 miR-202 的反义锁核核苷酸, 实时荧光定量反转录 PCR 技术和整体原位杂交技术结果显示 miR-202 反义锁核核苷酸可以显著下调斑马鱼胚胎中 miR-202 表达水平, 同时发现反义抑制 miR-202 后胚胎发育停滞在 4 hpf 时左右。共同注射 miR-202 前体可以部分挽救反义抑制 miR-202 后导致的胚胎发育停滞。本研究证明 miR-202 在斑马鱼胚胎发育过程中起着重要的调控作用, 其功能是斑马鱼胚胎早期发育所必需的。为进一步探索 miR-202 在鱼类胚胎发育过程的功能奠定了基础。

关键词: 斑马鱼; 胚胎发育; miR-202; 基因沉默技术

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

MicroRNA(miRNA)是一类长约 22 个核苷酸的非编码 RNA 分子, 通过与靶 mRNA 的 3' 端非翻译区(3' UTR) 碱基配对进行基因转录后调控^[1-2]。2000 年 REINHART 等^[3]在线虫中发现调控时序性发育的基因 *let-7*, 随后逐渐在人类、果蝇、小鼠等多种生物中鉴定出更多的 miRNAs, 已经发现 miRNA 在细胞增殖、代谢、凋亡、肿瘤形成以及免疫等众多不同的生物过程中起着重要作用^[4-7]。目前, miRNAs 作为动物发育过程中的一类重要调控因子而被广泛关注, 它们在斑马鱼发育及正常生理过程中的调控功能也逐渐被揭示^[8]。

miR-202 是与细胞分化相关的 *let-7* 家族成员, 其序列和功能在脊椎动物物种间具有高度保守性^[9]。已有研究表明, miR-202 在胃癌、乳腺癌、宫颈鳞状上皮细胞癌、大肠癌、滤泡性淋巴瘤等人类癌病中具有抑癌作用^[10-14]。另一项研究表明原癌基因 *MYCN* 是 miR-202 的直接靶点,

可以抑制神经母细胞瘤细胞增殖^[15]。miR-202 在小鼠、非洲爪蟾、大西洋圣日比目鱼成熟精巢和鸡幼崽的精巢中特异性表达^[16-19], 在胚胎小鼠性腺发育与分化和功能行使上起重要作用^[16]。有报道 miR-202 在鼠性腺中特异性表达, 其表达受到上游性别决定因子 *sox9* 的调控^[20]。而斑马鱼作为研究发育生物学的理想脊椎动物模型, 却没有 miR-202 在斑马鱼早期胚胎发育中的表达量和调控作用的相关报道。

在本研究中, 我们首先利用实时定量反转录 PCR 技术和整体原位杂交技术(Whole mount *in situ* hybridization WISH)检测了 miR-202 在斑马鱼胚胎发育过程中的表达, 随后采用锁核酸(locked nucleic acid, LNA)修饰的 miR-202 反义核酸显微注射斑马鱼第一细胞期胚胎, 发现阻断 miR-202 功能导致斑马鱼胚胎发育停滞在受精后 4 hpf 左右, 证明 miR-202 是斑马鱼胚胎发育所必需的, 本研究为 miR-202 在斑马鱼早期胚胎发育中的功能

收稿日期: 2016-02-17 修回日期: 2016-05-11

基金项目: 国家自然科学基金(31130049); 上海市自然科学基金(13ZR1419500); 上海市教委水产学一流学科项目(沪教科 2012-62)

作者简介: 许彦娜(1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为遗传与发育生物学。E-mail: catalya_xu@126.com

通信作者: 陈良标, E-mail: lbchen@shou.edu.cn

研究提供了重要基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用斑马鱼均为野生型 AB 品系,购自北京中国科学院遗传与发育生物学研究所,繁殖饲养与交配取卵参照斑马鱼手册中的方法进行。水温为 28.5 °C,明暗光照周期分别为 14 h、10 h。

1.2 仪器与试剂

实验仪器包括冷冻离心机 5417R (Eppendorf)、Milli-Q 超纯水仪 (Millipore)、分光光度计 Nandrop (Thermo Scientific)、微量注射泵 PLI-100A Plus、垂直拉针仪 PC-10、磨针仪 EG-400、立体显微镜 Stemi 2000 和荧光定量 PCR 仪 CFX96 (Bio-Rad) 等。

试剂包括 mirVana™ miRNA Isolation Kit (Ambion)、PrimeScript® RT reagent Kit With gDNA Eraser (TaKaRa)、SYBR Green (Roche)、DEPC、苯酚、氯仿、异戊醇、乙醇和异丙醇等试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 实验方法

1.3.1 LNA-anti-202、pre-miR-202 的显微注射

根据 miRBase (<http://www.mirbase.org/>) 网站中 miR-202 成熟序列,斑马鱼 LNA-anti-202 和标准阴性对照 LNA-anti-NC 合成于 Exqion 公司 (表 1);斑马鱼 pre-miR-202 (miR-202 前体) 合成于 Biomics 公司 (表 1)。所有的反义核苷酸及前体均溶解在 DEPC 水中。注射浓度:LNA-anti-202 和 LNA-anti-NC 均为 200 μmol/L;pre-miR-202 为

10 μmol/L,注射体积为 1 nL/胚胎,注射部位为动物极。所有显微注射用的胚胎均为 1 细胞受精卵阶段,注射后的胚胎在 28.5 °C 的培养箱中培养观察,死亡的胚胎及时清除以排除对正常发育胚胎的影响。观察时间点为 1、2、4、6、8、24 hpf,用显微镜观察并拍照。

1.3.2 整体原位杂交

由 Exqion 公司合成 3' 地高辛标记的 miR-202 探针 (表 1)。收集不同发育时期的斑马鱼胚胎,即 2、4、6、8、10、24 hpf,用 4% 多聚甲醛 (PFA) 溶液固定过夜 (至少 12 h 以上)。然后保存于甲醇溶液中,置于 -20 °C 备用。24 hpf 的胚胎,需先用 10 mg/mL 胰酶消化脱去卵膜后,再用 4% PFA 固定。每个 Eppendorf 1.5 mL EP 管中加 10 个 (最多不超过 50 个) 胚胎,经系列甲醇/PBST (75%、50%、25%、0) 水合、蛋白酶 K 消化 (如果胚胎小于 10 hpf,直接在 PBST 中洗 2 次,不需用蛋白酶 K 消化) 和 4% PFA 再固定 10 min。移去固定液,用 PBST 洗涤,然后在预杂交液中,58 °C 预杂交 3 h。接着置于含 20 ~ 80 nmol/L 探针的杂交液中,58 °C 杂交过夜。多余的探针于 58 °C 经 2 × SSC,0.2 × SSC 洗涤,再于室温下经系列 0.2 × SSC/PBST 溶液 (75%、50%、25%、0) 洗涤,以含山羊血清的 PBST 溶液室温封闭探针 3 h;在稀释 5 000 倍的抗地高辛抗体 (anti-Dig-AP) 中,4 °C 过夜;未结合的抗体用 1 × PBST 溶液洗去,再加入显色溶液 (NBT + BCIP 溶液) 显色 1 h,迅速用终止液洗去多余的显色液,显微镜观察拍照并记录。

表 1 本研究涉及 RNA 序列

Tab. 1 Sequences of RNA

名称 Name	序列 (5'→3') Sequences
LNA-anti-202	UUUCCCAUGCCCUAUGCCUCU
LNA-anti-NC	UUGUACUACACAAAAGUACUG
miR-202 探针	UUUCCCAUGCCCUAUGCCUCU
pre-miR-202	CUGUCCUUUUUCCUAUGCAUAUACCUCUUUGACAUGCUGCUUU AAAGAGGCAUAGGGCAUGGAAAAUUGGGCGG

1.3.3 miRNA 分离及实时荧光定量反转录 PCR

依据 Ambion 公司的 mirVana™ miRNA 分离试剂盒说明书分离 miRNA,由分光光度计定量 miRNA 最终浓度。利用 DNASTar 设计 miR-202 的颈环引物序列 (表 2);用 Premier 5.0 软件设计

miR-202 引物序列并以 U6 snRNA 作为内参由上海生工生物技术有限公司合成 (表 2)。按试剂盒说明书取 1 μg 的总 miRNA 样品,用 miR-202 颈环引物及 U6 RT P/U6-Rev 引物反转录合成 cDNA 第一链。实时定量 qPCR 按照每个处理 3

个重复,每个样品 3 次重复进行。20 μ L 反应体系为:2 \times SYBR Green, 10 μ L; 引物,各 1 μ L; cDNA 模板,2 μ L; 加 DEPC 水补充至 20 μ L。

PCR 程序设定为:95 $^{\circ}$ C, 10 min; 95 $^{\circ}$ C, 20 s; 60 $^{\circ}$ C, 20 s; 72 $^{\circ}$ C, 30 s, 共 40 循环; 72 $^{\circ}$ C, 10 min。

表 2 实时定量反转录 PCR 引物
Tab. 2 Primers for real-time RT-PCR

引物 Primers	引物序列(5'→3') Primer sequences
202qPCR-Fwd	GCGAGAGGCATAGGGCATG
202qPCR-Rev	CAGTCAGGGTCCGAGGTAT
U6-Fwd	TTGGTCTGATCTGGCACATATA
U6 RT P/U6-Rev	AAAAATATGGAGCGCTTCACG
miR-202 的颈环引物	GTCGTATCCACTGCAGGGTCCGAGGTATT CGCACTGGATACGACTTTTCC

1.3.4 数据分析

实时荧光定量 PCR 反应结束后读取 Ct 值,以 U6 snRNA 为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 miR-202 的相对表达量。用 GraphPad Prism 5 软件进行数据作图以及单因素方差分析, $P < 0.05$ 为显著差异。数据结果以平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SE) 表示。

2 结果与分析

2.1 miR-202 在斑马鱼早期胚胎发育过程中的表达

为了揭示 miR-202 在斑马鱼胚胎发育过程中的功能,我们首先采用实时荧光定量反转录 PCR 检测了 miR-202 在斑马鱼胚胎发育过程各个时期的表达。结果显示,miR-202 在未受精的鱼卵中表达水平最高,受精后水平显著下降。miR-202 在斑马鱼胚胎发育整个过程保持表达,早期发育阶段在 2 细胞期时表达量最高,随后降低,在 2 h 达到最低,在此之后水平持续上升并在 72 h 达到高峰(图 1)。

同时我们还运用整体原位杂交检测了 miR-202 在斑马鱼胚胎中的表达。结果显示,miR-202 在斑马鱼胚胎发育过程中持续表达(图 2),与实时荧光定量反转录 PCR 结果相一致。上述结果提示我们 miR-202 可能在斑马鱼胚胎发育过程中起调控作用。

2.2 反义抑制 miR-202 引起胚胎发育停滞

为了研究 miR-202 在斑马鱼胚胎发育中的功能,我们采用反义核酸 LNA-anti-202 注射斑马鱼受精卵来抑制 miR-202 的功能。结果显示 miR-202 的阴性对照(LNA-anti-NC)注射组胚胎在 1、2、4、6 和 8 hpf 等时间点与野生型胚胎相比均无

明显发育异常(图 3a, b)。LNA-anti-202 注射后在 1、2 和 4 hpf 时间点与阴性对照组和野生型胚胎相比,发育无明显异常,但是在 4 hpf 后胚胎发育明显异常,主要表现在胚胎发育停滞在 4 hpf 发育时期,并在 6 到 8 hpf 之间陆续死亡(图 3c)。

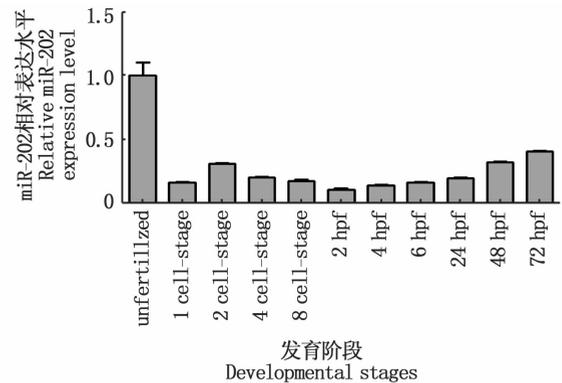


图 1 miR-202 在斑马鱼胚胎发育过程中各时期表达变化

Fig. 1 The expression of miR-202 during the zebrafish embryonic development

2.3 miR-202 被反义抑制后在斑马鱼早期胚胎发育过程中各个时间点的水平变化

为了证明上述发现是 miR-202 功能被抑制的结果,我们检测了 LNA-anti-202 注射后 miR-202 的水平。通过提取野生型以及注射 LNA-anti-202、LNA-anti-NC 的早期斑马鱼胚胎的 miRNA,以 U6 snRNA 为内参进行实时荧光定量反转录 PCR 检测 miR-202,结果发现注射 LNA-anti-202 的斑马鱼胚胎 miR-202 水平与野生型胚胎及注射 LNA-anti-NC 的胚胎相比有显著性的降低(图 4)。

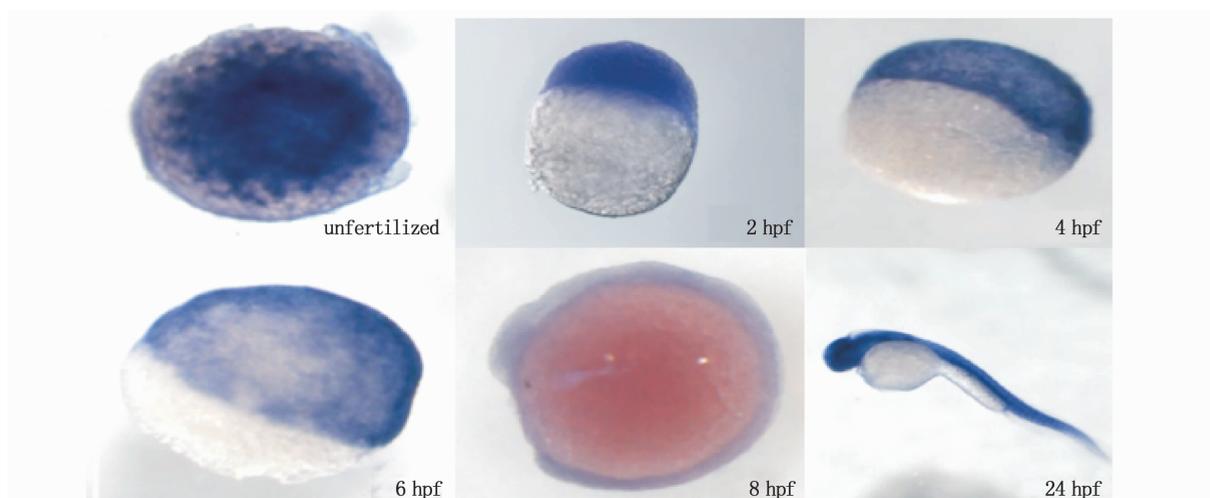


图 2 miR-202 在斑马鱼早期胚胎发育过程中的空间表达

Fig. 2 The spatial expression of miR-202 during the zebrafish embryonic development

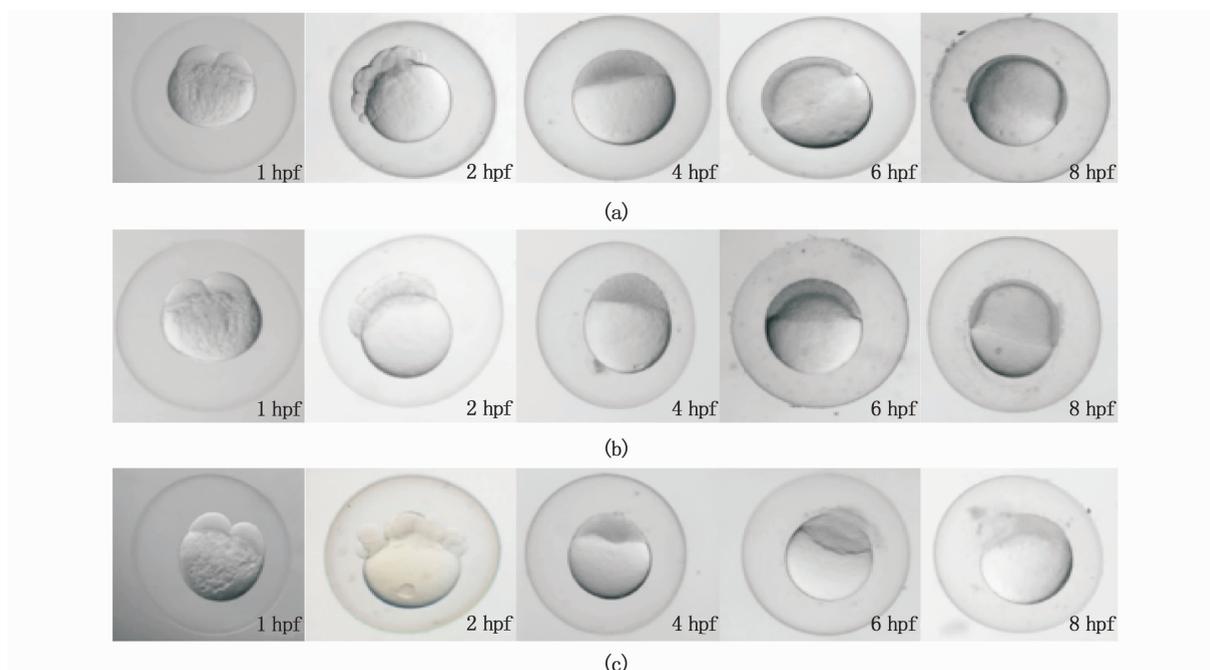


图 3 显微注射 LNA-anti-202 对斑马鱼胚胎发育的影响

Fig. 3 Effect on the zebrafish embryonic development by microinjection of LNA-anti-202

(a) 野生型斑马鱼胚胎; (b) 显微注射的对照组斑马鱼胚胎; (c) 显微注射 LNA-anti-202 斑马鱼早期胚胎

(a) Wild-type zebrafish embryos; (b) LNA-anti-NC injected zebrafish embryos; (c) LNA-anti-202 injected zebrafish embryos

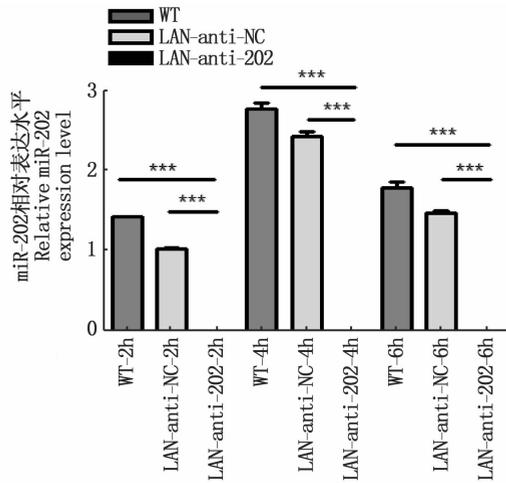


图 4 miR-202 被反义抑制后在斑马鱼早期胚胎发育中的水平变化
Fig. 4 Expression of miR-202 after microinjection of LNA-anti-202

* 表示差异极显著 ($P < 0.01$)
 * indicates there is a significant difference

同时,我们还利用整体原位杂交技术检测了 miR-202 的水平。结果显示,注射 LAN-anti-202 后斑马鱼 4 hpf 胚胎与野生型相比,未检测到 miR-202 的表达,与实时荧光定量反转录 PCR 结

果相一致(图 5)。

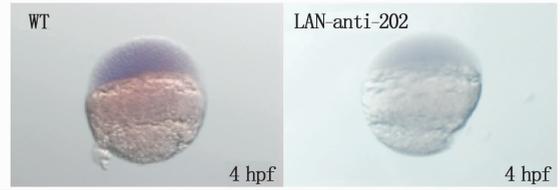


图 5 miR-202 被反义抑制后的空间表达
Fig. 5 Spatial expression of miR-202 after microinjection of LNA-anti-202

2.4 pre-miR-202 和 LNA-anti-202 共注射进行挽救

为了证明抑制 miR-202 导致的胚胎发育停滞是 LNA-anti-202 特异性的作用,我们共注射 pre-miR-202 和 LNA-anti-202 于斑马鱼胚胎,每隔一段时间进行表型观察以及照片拍摄,记录鱼卵的畸形率以及死亡率。其结果显示,共注射 pre-miR-202 和 LNA-anti-202 后,胚胎可以度过 4 hpf 发育期,但是在 6 ~ 24 hpf 发育期陆续停滞死亡。因此 pre-miR-202 可以部分挽救由 miR-202 敲降所引起的胚胎发育停滞(图 6)。

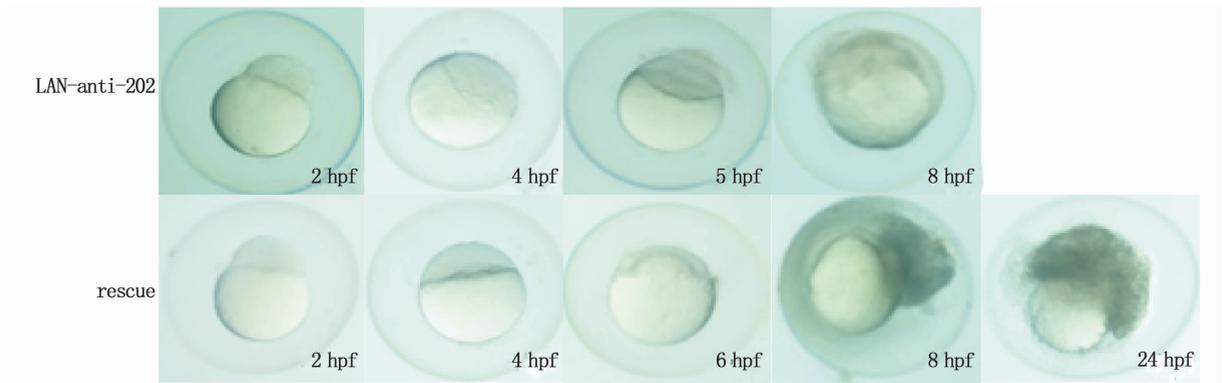


图 6 斑马鱼受精卵共注射 pre-miR-202 和 LNA-anti-202
Fig. 6 Co-injection of pre-miR-202 and LNA-anti-202 rescued the zebrafish embryonic development

rescue 表示 pre-miR-202 和 LNA-anti-202 共注射
 rescue indicates the co-injection of pre-miR-202 and LNA-anti-202

3 讨论

早期研究发现 miR-202 在多种生物的性腺发育分化中特异性表达,如鸡胚性腺向雄性分化时,miR-202 表达上调^[21],在性别决定基因 *sox9* 缺陷大鼠中,miR-202 表达下调^[20]等,因此 miR-202 可作为睾丸发育分化的特征性 miRNA。这也

预示着 miR-202 可能在调控组织发育分化中起重要作用。而斑马鱼胚胎发育中涉及多种器官组织的发育与分化,但是 miR-202 在胚胎发育中的调控作用却鲜有研究,为了研究 miR-202 在斑马鱼早期胚胎发育中的调控功能,首先要研究它在胚胎发育过程中的表达。

本研究通过实时荧光定量反转录 PCR 技术

和整体原位杂交技术发现 miR-202 在斑马鱼未受精卵中表达水平最高,提示 miR-202 是母源性分子。miR-202 在整个胚胎发育过程持续表达,说明 miR-202 可能在斑马鱼胚胎发育整个过程中起作用。尽管有报道 miR-202 初始转录产物 (pri-miR-202) 在小鼠胚胎发育 11.5 dpc 性腺中有所表达,但在小鼠早期胚胎发育过程中未检测到^[20]。成熟 miR-202 在早期胚胎发育过程中的表达也未曾有报道,提示母源性 miR-202 可能调控斑马鱼早期胚胎发育相关基因的表达。

通过注射 miR-202 的反义锁核苷酸诱导斑马鱼胚胎发育至 4 hpf 停滞,并在 6~8 hpf 之间死亡;共注射 miR-202 前体可以部分挽救胚胎发育异常,证实 miR-202 的敲降特异性可引起胚胎发育异常。这些结果证明 miR-202 功能是斑马鱼胚胎发育早期所必需的,其功能丧失将导致胚胎发育彻底停滞在 4 hpf。共注射 miR-202 前体只能部分挽救 miR-202 反义核酸引起的发育阻滞,在证明了 miR-202 反义核酸作用特异性的同时,也提示我们斑马鱼胚胎发育顺利完成可能需要 miR-202 水平和功能的精准控制。

miR-202 如何发挥调控作用是需要进一步研究的问题。由于 miRNA 主要通过调控下游靶基因 mRNA 来发挥作用,所以鉴定其靶基因是其进一步功能研究的重要部分。虽然有报道,miR-202 通过调控靶基因 ALR5A、LRP6、Gli2、MYCN 等抑制细胞增殖从而具有抑癌作用^[22],而 miR-202 调控早期胚胎发育的靶基因却未曾有相关报道。斑马鱼早期胚胎发育过程基因表达是极其复杂的,胚胎发育也包含很多事件,例如三胚层的分化,细胞运动、器官的生成以及体节的形成等,涉及到 Bmp 信号通路、Wnt 信号通路和 Nodal 信号通路等,这些调控因子控制着细胞的分化、运动等,其中非经典的 Wnt 信号对原肠的形成是至关重要的^[23]。而 miR-202 被反义抑制引起胚胎在发育到 4 hpf,即囊胚晚期(球形期)时停滞,此时期的细胞重排比任何发育阶段都要快,并且即将进入原肠期,提示 miR-202 可能调控细胞迁移相关因子。我们后续研究将围绕寻找 miR-202 的靶基因实验展开,以揭示 miR-202 在早期胚胎发育过程的调控机制。

参考文献:

- [1] NILSEN T W. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells [J]. *Trends in Genetics*, 2007, 23 (5): 243-249.
- [2] STEFANI G, SLACK F J. Small non-coding RNAs in animal development [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008, 9(3): 219-230.
- [3] REINHART B J, SLACK F J, BASSON M, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 2000, 403 (6772): 901-906.
- [4] LI X F, YANG W J, YE W W, et al. microRNAs: novel players in hepatitis C virus infection [J]. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 2014, 38(6): 664-675.
- [5] ZHANG X F, ZHENG Y, JAGADEESWARAN G, et al. Identification of conserved and novel microRNAs in *Manduca sexta* and their possible roles in the expression regulation of immunity-related genes [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 47: 12-22.
- [6] YI R, FUCHS E. MicroRNAs and their roles in mammalian stem cells [J]. *Journal of Cell Science*, 2011, 124: 1775-1783.
- [7] XU Q, ZHANG Y, CHEN Y, et al. Identification and differential expression of microRNAs in ovaries of laying and broody geese (*Anser cygnoides*) by solexa sequencing [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e87920.
- [8] MISHIMA Y. Widespread roles of microRNAs during zebrafish development and beyond [J]. *Development, Growth & Differentiation*, 2012, 54(1): 55-65.
- [9] ROUSH S, SLACK F J. The *let-7* family of microRNAs [J]. *Trends in Cell Biology*, 2008, 18(10): 505-516.
- [10] ZHAO Y, LI C L, WANG M, et al. Decrease of miR-202-3p expression, a novel tumor suppressor, in gastric cancer [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69756.
- [11] IORIO M V, FERRACIN M, LIU C G, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer [J]. *Cancer Research*, 2005, 65(16): 7065-7070.
- [12] ZHANG Y L, DAI Y, HUANG Y S, et al. Microarray profile of micro-ribonucleic acid in tumor tissue from cervical squamous cell carcinoma without human papillomavirus [J]. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 2009, 35 (5): 842-849.
- [13] AYAZ L, GÖRÜR A, YAROĞLU H Y, et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with laryngeal squamous cell carcinoma: potential early-detection markers for laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2013, 139 (9): 1499-1506.
- [14] HOFFMAN A E, LIU R, FU A, et al. Targetome profiling, pathway analysis and genetic association study implicate miR-

- 202 in lymphomagenesis [J]. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2013, 22(3): 327-336.
- [15] BUECHNER J, TOMTE E, HAUG B H, et al. Tumour-suppressor microRNAs let-7 and mir-101 target the proto-oncogene MYCN and inhibit cell proliferation in MYCN-amplified neuroblastoma [J]. *British Journal of Cancer*, 2011, 105(2): 296-303.
- [16] RO S, PARK C, SANDERS K M, et al. Cloning and expression profiling of testis-expressed microRNAs [J]. *Developmental Biology*, 2007, 311(2): 592-602.
- [17] NOVOTNY G W, NIELSEN J E, SONNE S B, et al. Analysis of gene expression in normal and neoplastic human testis: new roles of RNA [J]. *International Journal of Andrology*, 2007, 30(4): 316-327.
- [18] BIZUAYEHU T T, BABIAK J, NORBERG B, et al. Sex-biased miRNA expression in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) brain and gonads [J]. *Sexual Development*, 2012, 6(5): 257-266.
- [19] BANNISTER S C, TIZARD M L V, DORAN T J, et al. Sexually dimorphic microRNA expression during chicken embryonic gonadal development [J]. *Biology of Reproduction*, 2009, 81(1): 165-176.
- [20] WAINWRIGHT E N, JORGENSEN J S, KIM Y, et al. SOX9 regulates microRNA *miR-202-5p/3p* expression during mouse testis differentiation [J]. *Biology of Reproduction*, 2013, 89(2): 34.
- [21] BANNISTER S C, SMITH C A, ROESZLER K N, et al. Manipulation of estrogen synthesis alters MIR202 expression in embryonic chicken gonads [J]. *Biology of Reproduction*, 2011, 85(1): 22-30.
- [22] SUN Z W, ZHANG T Q, HONG H Y, et al. miR-202 suppresses proliferation and induces apoptosis of osteosarcoma cells by downregulating Gli2 [J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2014, 397(1/2): 277-283.
- [23] SCHIER A F, TALBOT W S. Molecular genetics of axis formation in zebrafish [J]. *Annual Review of Genetics*, 2005, 39: 561-613.

miR-202 inhibition leads to early termination of zebrafish embryonic development

XU Yanna¹, HAN Bingshe^{1,2}, ZHENG Yinghui³, DAI Zhonghua³, CHEN Liangbiao^{1,2}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai 201306, China; 3. Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: To learn the role of miR-202 in the zebrafish embryonic development, miR-202 expression was detected using qRT-PCR and WISH. The results indicated that miR-202 is a maternal molecule and expressed continuously during the zebrafish embryonic development, especially at the early stages. Knockdown of miR-202 was performed by microinjecting the locked nucleic acid modified antisense oligo of miR-202. The results showed that antisense oligo of miR-202 decreased miR-202 level significantly, accompanied with an early termination of the zebrafish embryonic development at around 4 hpf. And miR-202 inhibition induced early termination could be partly rescued by co-injection of pre-miR-202, indicating that miR-202 is required for the early zebrafish embryonic development. The present study for the first time unveils the essential role of miR-202 for the zebrafish embryonic development.

Key words: zebrafish; embryonic development; miR-202; knockdown