

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.01211

## 牙鲆 *let-7* 基因的克隆与表达及其靶基因预测

施志仪, 吴明林, 付元帅

上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

**摘要:** *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过程中起着极其重要的作用。为探讨 *let-7* 对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)从幼体到成体转变的变态发育过程的影响, 本实验对 *let-7* 进行了克隆与表达研究, 并预测了其可能的靶基因。利用普通 PCR 技术从牙鲆中成功鉴定出 *let-7* 及其前体序列, 该前体序列在不同的物种间具有高度的保守性。运用实时荧光定量 RT-PCR 方法分析 *let-7* 在牙鲆变态发育不同阶段的表达, 结果发现, 水温(16±0.5) 条件下, 在牙鲆变态发育的前 5 个阶段(孵化后 17、20、23、29、36 d), *let-7* 的表达量逐渐上升, 在变态末期(36 dph)达到高峰, 变态结束(41 dph)时表达量呈现下降的趋势。实时荧光定量数据表明, 甲状腺激素(T3)上调牙鲆肾细胞中 *let-7* 的表达, 在浓度为 75 nmol/L 时, 表达量达到最高。靶基因预测发现, *let-7* 作用于多样的靶基因, 其靶基因可能参与生长发育、细胞分化、信号转导、病毒免疫等生物过程。本研究建立了 *let-7* 在牙鲆变态发育过程中的表达谱, 并在细胞水平研究了 T3 对 *let-7* 表达量的影响, 预测了其可能的靶基因, 为研究 *let-7* 在牙鲆变态发育过程中的调控机制奠定了基础。

**关键词:** 牙鲆; *let-7*; 克隆与表达; 变态; 甲状腺激素; 靶基因

中图分类号: S91

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)06-1211-08

MicroRNA(miRNA)是一类长约 22 个核苷酸的非编码小分子 RNA, 由具有发夹结构的 70~90 个碱基大小的单链 RNA 前体经过 Dicer 酶加工后而生成, 通过与靶基因的 3'非翻译区(3'-UTR)结合, 在转录后水平调控基因的表达<sup>[1]</sup>。MiRNA 广泛存在于动、植物体中, 具有很高的保守性。*lin-4*、*let-7* 是最初发现的 2 个 miRNAs, 它们通过作用于各自的靶基因调控线虫(*Caenorhabditis elegans*)的时序发育<sup>[2-3]</sup>。之后大量的 miRNA 相继在不同物种中被发现, 至 2011 年 3 月, miRBase 数据库 (<http://microrna.sanger.ac.uk/>) 中收录的 miRNA 为 15 172 个: 人 1 114 个、小鼠 718 个、河鲀 425 个、斑马鱼 501 个、还包括病毒编码的及其他物种中的共 12 414 个<sup>[4]</sup>。miRNA 以 2 种方式作用于目的基因: miRNA 与靶基因不完全配对

时, 抑制靶基因的翻译; miRNA 与靶基因完全配对时, 降解靶基因。每个 miRNA 可以有多个靶基因, 而几个 miRNA 也可以共同调节同一靶基因, 从而形成复杂的调控网络, 调控基因的表达<sup>[5]</sup>。miRNA 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、细胞凋亡、细胞分裂以及器官的发育等<sup>[6-8]</sup>。

变态是某些生物在发育过程中, 由于细胞生长和分化使身体结构发生明显变化的过程<sup>[9]</sup>。在牙鲆早期生活史中有一从仔鱼向稚鱼转变的变态过程。研究表明, 在牙鲆变态过程中组织内甲状腺激素水平骤然升高, 而变态结束后又恢复到较低水平。Yamano 等<sup>[10-11]</sup>研究表明, 施用外源性甲状腺激素(thyroid hormone)能诱导仔鱼骨骼肌细胞形态发生改变, 使肌钙蛋白和肌球蛋白轻链提

收稿日期: 2011-03-28; 修订日期: 2011-05-13.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31172392); 上海重点学科项目(S30701).

作者简介: 施志仪(1954-), 教授, 博士生导师, 主要从事细胞分子生物学及水生生物分子遗传学等研究. E-mail: zyshi@shou.edu.cn

早转变为成体型,以适应仔鱼从浮游性生活向底栖性生活的转变。Miwa 等<sup>[12]</sup>研究发现,在仔鱼变态过程中,甲状腺激素能使体内血红细胞从幼体型转变为成体型。进一步研究发现,外源性甲状腺激素可以有效促进牙鲆的变态,增加牙鲆变态过程中仔鱼的成活率<sup>[13]</sup>。

*let-7* 是目前研究最为广泛的 miRNA 之一。*let-7* 在果蝇(*Drosophila melanogaster*)进入幼虫至成虫的变态发育期间才开始表达,促进果蝇从幼虫到成虫的变态发育进程,*let-7* 基因的缺失会导致果蝇变态失败,造成变态过程中果蝇的大量死亡<sup>[14-15]</sup>。进一步研究发现,*let-7* 是一个时序发育基因,其在线虫(*Caenorhabditis elegans*)幼虫末期,在斑马鱼孵化后 48 h,在环节动物和软体动物的成年阶段高度表达,主要功能表现为促进生物从幼体向成体转变的时序发育进程<sup>[16-17]</sup>。

在牙鲆从幼体向成体转变的变态发育期间,*let-7* 基因是否具有同样的功能还未见报道。因此,本实验以牙鲆为研究对象,重点研究了 *let-7* 在其变态发育过程中的表达情况,并从体外研究甲状腺激素(T3)对 *let-7* 表达水平的影响,探究其对牙鲆变态发育的影响及其 *let-7* 在牙鲆变态发育过程中可能的调控网络。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验用鱼

实验用的仔鱼取材于中国水产科学研究院北戴河中心实验站。实验过程中每天吸污、换水,水温控制在(16±0.5)℃,盐度 30,每天定时投喂卤虫幼体。依据 Miwa 等<sup>[18]</sup>的变态分期方法并结合右眼移位的程度,变态期牙鲆被分成 6 个阶段:17 日龄(17 dph)还未变态的仔鱼,变态 I 期(20 dph)、变态 II 期(23 dph)、变态 III 期(29 dph)、变态 IV 期(36 dph)、变态 V 期(41 dph)。每个时期样品取 3 个生物学重复,以保证实验的准确性,减少实验误差。

### 1.2 细胞培养及药物处理

牙鲆肾细胞由中国水产科学研究院黄海水产

研究所陈松林老师惠赠。用 DMEM 培养基培养,培养基中含 15%胎牛血清、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μg/mL、bFGF 2 ng/mL、Hepes 20 mmol/L,置于 24℃培养箱中培养。细胞长满整瓶后用 0.25%胰酶消化传入六孔板中,待细胞长满孔板更换新鲜培养基,同时加入甲状腺激素(T3)溶液作用 24 h,参考田娟<sup>[19]</sup>等对大菱鲆细胞的实验,将溶液的终浓度分别定为 0、50 nmol/L、75 nmol/L、100 nmol/L、200 nmol/L,每个浓度设 3 个重复。

### 1.3 总 RNA 的提取与 cDNA 的合成

用 TRIzol 法提取牙鲆变态 6 个阶段以及肾细胞中的总 RNA,每个样品取 3 个生物学重复,抽提的总 RNA 经 DNA 酶(Promega, USA)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<sup>[20]</sup>(表 1)。

### 1.4 DNA 的提取

用组织 DNA 提取试剂盒(Omega, USA)提取牙鲆 DNA,用于扩增 *let-7* 前体。

### 1.5 PCR 扩增

PCR 反应体系为:10×PCR Buffer(Mg<sup>2+</sup>)2 μL、MgCl<sub>2</sub> 1.2 μL、dNTP 1.6 μL、10 μmol/L 上下游引物各 0.5 μL(表 1)、5 U/μL 的 *Taq* DNA 酶 0.2 μL、反转录产物或 DNA 1 μL,补充 ddH<sub>2</sub>O 至 20 μL。反应条件为:94℃预变性 3 min;94℃变性 30 s、60℃退火 30 s、72℃延伸 10 s,共 35 个循环;72℃延伸 5 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测,回收、纯化、连接后测序(大连宝生物工程有限公司)。

### 1.6 实时荧光定量 PCR

样品 cDNA 进行 10 倍系列稀释,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、10 μmol/L 上下游引物各 0.4 μL、cDNA 模板 2 μL,加 ddH<sub>2</sub>O 至 20 μL。采用两步法 PCR 扩增标准程序,循环参数为 95℃ 预变性 10 s 后,95℃ 变性 10 s,60℃ 退火 30 s,共 40 个循环。融解曲线制备:55~90℃,每 0.5℃收集 1 次荧光信号,共 71 个循环。以 5S rRNA 为内参基因,对定量结果进行分析。

表 1 引物序列  
Tab.1 Primers used for PCR analysis

| 引物 primer              | 序列(5'-3') sequence(5'-3')                   |
|------------------------|---|
| <i>let-7</i> RT Primer | CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAACCATAC |
| <i>let-7-F</i>         | ACACTCCAGCTGGGTGAGGTAGTTGGTTGT              |
| <i>let-7-R</i>         | AACTGGTGTCTGGAG                             |
| <i>Pre-let-7-F</i>     | TGAGGTAGTAGTTGTATAGTT                       |
| <i>Pre-let-7-1R</i>    | TAGGAGGCTGTACAGTCATCTC                      |
| <i>Pre-let-7-2R</i>    | AAAGACAGTAAAGTTGTATAGTT                     |
| <i>Pre-let-7-3R</i>    | AAGGTAATAGACTGTATAGTTA                      |
| 5S-rRNA-F              | CCATACCACCCTGAACAC                          |
| 5S-rRNA-R              | CGGTCTCCCATCCAAGTA                          |

### 1.7 靶基因预测

到 2011 年 3 月为止, NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) 中收录的牙鲈 mRNA 为 482 个。以 miRanda<sup>[21]</sup>和 RNAhybrid<sup>[22]</sup>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-7* 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-19 kcal/mol, 自由能越低代表 *let-7* 与 mRNA 之间结合越紧密。

### 1.8 数据分析

采用 One-Way 方差分析, 用 SAS 软件中 Duncan's Multiple Range Test 比较 *let-7* 在不同发育时期以及不同药物浓度下的相对表达, 当  $P < 0.05$  时差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 *let-7* 的克隆

以牙鲈 cDNA 为模板, 用引物 *let-7-F* 和 *let-7-R* 进行 *Let-7* 的扩增(表 1), 3%琼脂糖凝胶电泳结果显示, 在 50~100 bp 间有 1 条明显的目的带(图 1), 与预期片段长度大小相符。测序结果与 miRBase 数据库中序列完全一致(5'-UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU-3'), 从牙鲈中成功地鉴定出 *let-7*。

### 2.2 *let-7* 前体的克隆与同源性比较

以牙鲈基因组 DNA 为模板, 用引物 *Pre-let-7-F* 和 *Pre-let-7-1R*、*Pre-let-7-2R*、*Pre-let-7-3R*(表 1)对牙鲈 *let-7* 3 个不同的前体进行扩增, 3%琼脂糖凝胶电泳结果显示, 在 Marker 50~100 bp 间均有 1 条明显的目的带(图 2), 测序结果及其用 Mfold 程序预测的二级结构见图 3。将牙鲈 *let-7* 3 个不同的前体

序列分别与人(*Homo sapiens*)、家鼠(*Mus musculus*)、红原鸡(*Gallus gallus*)、斑马鱼(*Danio*

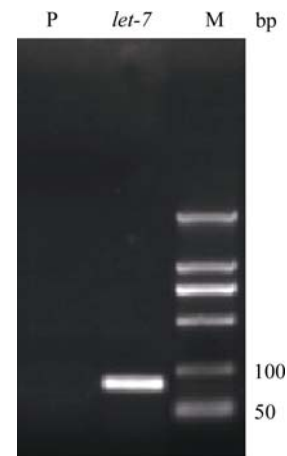


图 1 *let-7* 电泳结果

M: DNA Maker; P: 阴性对照.

Fig. 1 RT-PCR result of *let-7*  
M: DNA Maker; P: negative control.

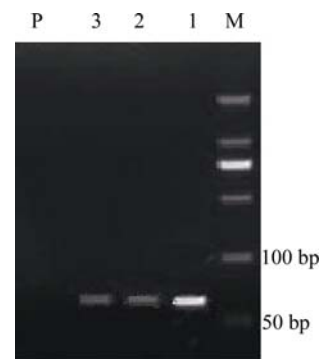


图 2 扩增 *let-7* 前体电泳结果

1、2、3 分别代表: *Pre-let-7-1*、*Pre-let-7-2*、*Pre-let-7-3*。

Fig. 2 RT-PCR result of *let-7* precursor  
1, 2 and 3 means respectively: *Pre-let-7-1*、*Pre-let-7-2*、*Pre-let-7-3*。

erio)、河鲀(*Fugu rubripes*)对应的前体序列进行比对,发现其差异性主要存在于前体序列中间的环状结构域(图 4)。牙鲆 *let-7* 前体与河鲀前体的序列相似性最高,其相似性接近 100%。

### 2.3 *let-7* 在牙鲆变态发育不同时期的表达

定量 RT-PCR 用于分析 *let-7* 在不同时期的表达情况(图 5)。在首先 1 个阶段(17 dph, 20 dph)*let-7* 表达量较低,随后 *let-7* 的表达量急剧上升,在变态末期(36 dph)达到最高,变态结束(41 dph),其表达量下降。变态前期阶段(17 dph, 20 dph),*let-7* 表达量分别是最高水平(36 dph)的 23%, 43%,表明存在差异表达( $P<0.05$ )。在 23 dph、29 dph、36 dph、41 dph, *let-7* 表达水平急剧上升,但不同时间点之间

差异不明显。

### 2.4 不同浓度 T3 对牙鲆肾细胞中 *let-7* 的影响

T3 浓度控制在 0~200 nmol/L 范围内,低浓度时,*let-7* 表达水平随着 T3 浓度的增加有递增的趋势,在 75 nmol/L 时, *let-7* 表达量达到最高水平,随后其表达量逐渐下降。T3 浓度为 50 nmol/L 时, *let-7* 的表达量是正常组的 2.3 倍( $P<0.05$ ); T3 浓度为 75 nmol/L 时, *let-7* 表达量达到最大值,表达量是正常组的 3.6 倍( $P<0.05$ ); 当 T3 浓度为 100 nmol/L 时, *let-7* 表达量是正常组的 2.3 倍( $P<0.05$ ); T3 浓度为 200 nmol/L 时, *let-7* 表达量约为正常组的 1.8 倍( $P<0.05$ ) (图 6)。

### 2.5 *let-7* 靶基因研究

预测 miRNA 靶基因对研究 miRNA 的功能有着

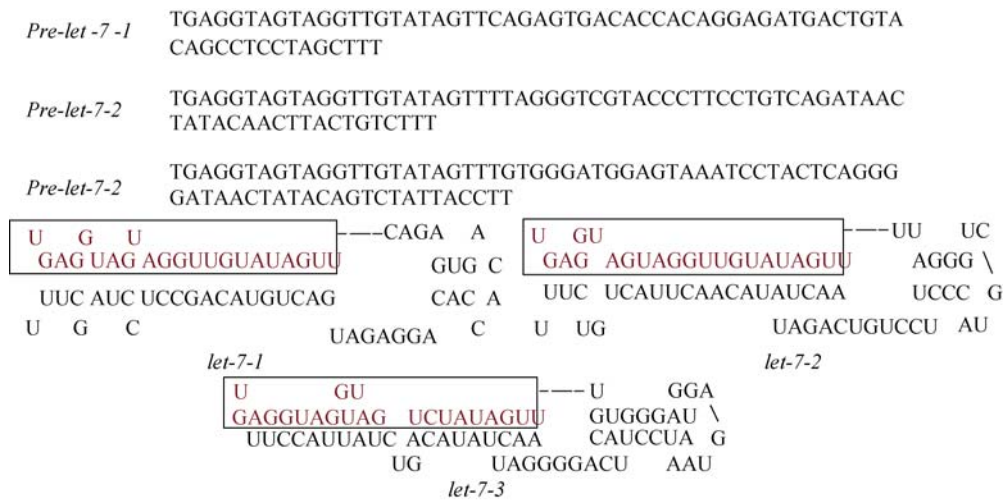


图 3 *let-7* 前体序列及其预测的二级结构(方框内为成熟的 *let-7* 序列)

Fig. 3 The sequences and deduced secondary structure of *let-7* precursor (square frame: mature *let-7* sequences)

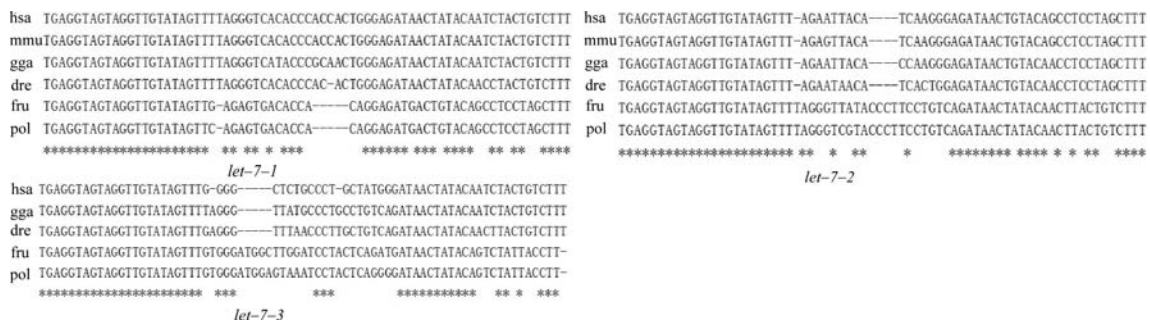
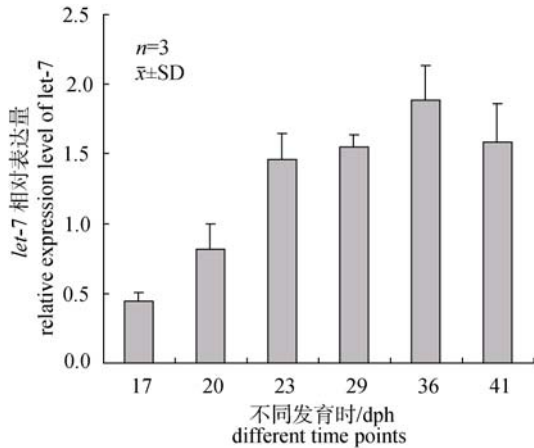
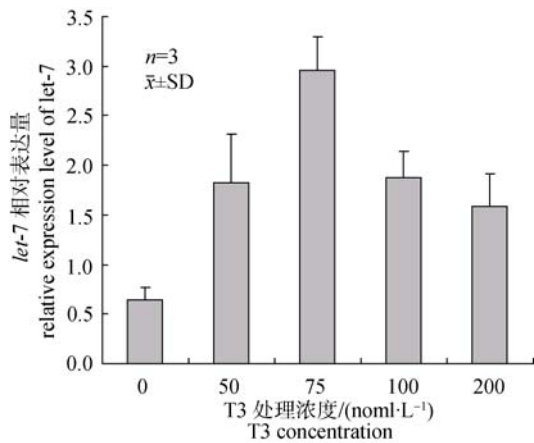


图 4 不同物种间 *let-7* 前体同源性比较

“\*”代表具有相同的碱基; has: 人; mmu: 小鼠; gga: 红原鸡; dre: 斑马鱼; fru: 河鲀; pol: 牙鲆。

Fig. 4 Homology comparison of *let-7* precursors from different species

Sequence conservation was indicated by asterisk. has: *Homo sapiens*; mmu: *Mus musculus*; gga: *Gallus gallus*, dre: *Danio rerio*; fru: *Fugu rubripes*; pol: *Paralichthys olivaceus*.

图 5 *let-7* 在牙鲆变态发育不同时期的表达情况Fig. 5 Relative expression of *let-7* at different time points of *Paralichthys olivaceus* metamorphosis图 6 不同浓度 T3 对牙鲆肾细胞中 *let-7* 表达量的影响Fig. 6 Relative expression of *let-7* in *Paralichthys olivaceus* kidney cell

重要的作用。将 *let-7* 与 NCBI 网站上已注册的牙鲆 mRNA 3'-UTR 序列进行比对, 预测到 29 个 mRNA 的 3'-UTR 序列存在 *let-7* 的结合位点, 其中转录因子和调节基因占多数 (表 2)。这 29 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, 包括蛋白合成、免疫应答、信号转导、转录调控和细胞周期调控等。

### 3 讨论

miRNA 广泛地存在于多种真核生物中, 从低等生物到人类都有其存在的痕迹, 其生物学特性主要表现为: 高度保守性, 时序表达特异性和组织表达特异性。*let-7* 在不同的物种间具有高度的

保守性, 是生物发育过程中重要的调控因子。本实验通过克隆的方法得到牙鲆 *let-7* 的序列, 随后通过对牙鲆基因组 DNA 的扩增, 获得 3 个不同的 *let-7* 前体序列, 命名为: *pre-let-7-1*、*pre-let-7-2*、*pre-let-7-3* (图 3), 用 Mfold 程序折叠形成完整的二级结构 (图 3)。牙鲆 *let-7* 是由这 3 个不同的 *let-7* 前体经剪切产生的相同的成熟序列, 随着牙鲆基因组信息的补充, 可能还存在其他的前体序列。将牙鲆 *let-7* 前体序列与人、家鼠、鸡、斑马鱼、河鲀对应的前体序列进行比对分析发现, 不同的物种间 *let-7* 前体序列的差异主要存在于环状结构区域, 可能是在物种进化过程中产生的差异。进一步分析发现, 牙鲆与河鲀 *let-7* 前体序列同源性高达 100%, 这可能是由于牙鲆 (鲽形目) 与河鲀 (鲀形目) 亲缘关系较近, 再加上 miRNA 基因具有高度保守性的原因。

*let-7* 和其他 miRNA 一样都具有组织特异性, 在不同组织, 不同器官及不同生物中 *let-7* 表达不尽相同, 如在软体动物、环节动物、斑马鱼中能检测到 *let-7* 表达, 但在植物、单细胞有机体中则不表达。*let-7* 的表达具有异时性, 在斑马鱼孵化后 48 h 开始表达, 在成年的环节动物和软体动物中才检测到 *let-7* 的表达<sup>[14]</sup>。*let-7* 在线虫发育的 L3/L4 期开始高度表达, 其在时序调节中的主要机制是抑制异时性基因 *lin-41* 和 *lin-28* 的表达, 从而促进线虫从 L4 期向成年期过渡并完成终末分化<sup>[16]</sup>。对果蝇研究发现, *let-7* 在果蝇变态期间开始表达, 并在变态末期表达量达到高峰, 促进果蝇向成体形态的转变<sup>[23]</sup>。可见, *let-7* 是一个异时性基因, 参与生物发育的时序性调节, 且在生物发育末期的高表达决定了生物从幼虫到成虫形态的转变。进一步研究发现, 发育末期急剧上调的 *let-7* 是通过抑制促进幼体细胞分化的关键异时性蛋白的表达, 从而促进幼虫到成虫形态的转变<sup>[24]</sup>。定量分析结果表明, 在牙鲆从幼虫到成虫的变态发育的过程中, *let-7* 表达量逐渐增强, 在变态末期 (36 dph) 达到最高, 变态结束 (41 dph) 后, 其表达量有下降的趋势。*let-7* 在牙鲆变态过程中的表达模式与其他已

表 2 *let-7* 靶基因预测  
Tab. 2 Target gene prediction of *let-7*

| 基因 gene          | 登录号<br>accession number | 功能 function                               | 最小自由能<br>MFE |
|------------------|-------------------------|---|--------------|
| Hsp70            | DQ662230.1              | 蛋白折叠 protein fold                         | -22.2        |
| IL-8             | AF216646.1              | 免疫反应 immune response                      | -21          |
| EIF5A            | FJ390056.1              | 蛋白生物合成/翻译 protein synthesis               | -23.6        |
| PLC-beta1        | FJ198070.1              | 细胞内信号转导 intracellular signal transduction | -20.5        |
| PLD2             | EU872185.1              | 细胞骨架蛋白 cytoskeletal protein               | -25.2        |
| thymosin beta    | EU586110.1              | 调控细胞周期 cell cycle regulation              | -23.6        |
| Dio2             | AB362422.1              | 激素生物合成 hormone biosynthesis               | -20          |
| Shh              | AB029748.1              | 左右不对称发育 left-right asymmetry development  | -19          |
| Par              | AB375266.1              | 钙离子结合蛋白 calcium-binding protein           | -19.3        |
| Ghr              | AB110985.1              | 骨骼发育 bone development                     | -19          |
| TRP2             | EU007656.1              | 蛋白水解 proteolysis                          | -19.4        |
| VDAC             | DQ821474.1              | 阴离子运输 anion transportation                | -22.9        |
| immunoglobulin D | AB052658.1              | 免疫应答 immune response                      | -20.9        |
| MHC              | AY848955.1              | 免疫应答 immune response                      | -21          |
| CD40             | AB081752.1              | 细胞凋亡 cell apoptosis                       | -22          |
| TNFR-1           | AB080946.1              | 免疫反应 immune response                      | -22.7        |
| IL-1b            | AB070835.1              | 免疫反应 immune response                      | -19.1        |
| Hsp40B11         | DQ199619.1              | 蛋白折叠 protein fold                         | -22.4        |
| spaw             | AB232903.1              | 左右不对称发育 left-right asymmetry development  | -19.6        |
| COL1A1           | AB196513.1              | 骨骼发育 bone development                     | -22.3        |
| HRI              | DQ193596.1              | 防御反应 defense response                     | -21.3        |
| Hsc71            | AB006814.1              | 蛋白折叠 protein fold                         | -22.8        |
| MyD              | AB241074.1              | 肌肉发育 muscle development                   | -20.6        |
| Decorin          | AY608584.1              | 器官形成 organogenesis                        | -22.2        |
| PY               | AB055213.1              | 细胞信号转导 cell signal transduction           | -22.5        |
| VDRb             | AB037673.1              | 转录调控 transcriptional regulation           | -20.3        |
| Ctrlr            | AB035315.1              | 骨骼发育 bone development                     | -20.9        |
| Cgrpr            | AB035314.1              | 骨骼发育 bone development                     | -19.2        |
| IGF-I            | AF061278.1              | 骨骼形成 bone formation                       | -28.1        |

注: 最小自由能(MFE)设置为-19 kcal/mol, MFE 越低代表 *let-7* 与靶基因之间结合越紧密。

Note: The predicted targets were evaluated in RNAhybrid with the minimum free energy (MFE) cutoff set at -19 kcal/mol. A highly stable RNA duplex was represented as having a very low MFE of hybridization.

研究的生物相似, 推测在牙鲆变态过程中, *let-7* 同样促进了牙鲆从幼体到成体转变的变态发育过程。

甲状腺激素在鱼类代谢活动、生殖、胚胎发育、仔鱼生长、变态及其存活等方面起着重要作用, 而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<sup>[25]</sup>。甲状腺激素进入细胞核后与受体结合, 激活受体, 并使之结合于基因的一段特定的 DNA 序列, 即甲状腺应答因子, 从而正向或反向调节特定基因的转录和表达<sup>[26]</sup>。许多

文献表明, 甲状腺激素诱导牙鲆变态是通过与 TRs 结合推动特异基因转录的结果<sup>[27]</sup>。从不同浓度 T3 处理后, 肾细胞中 *let-7* 表达量的变化来看, T3 对 *let-7* 存在一定的调控作用, 不同浓度 T3 处理后, *let-7* 表达量均增加, 并与对照组存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), 表明 T3 促进了 *let-7* 的表达。但随着 T3 浓度的增加, *let-7* 表达量有下降的趋势, 这表明在超出一定的范畴后, 高浓度的 T3 会相对抑制 *let-7* 的表达。T3 浓度为 75 nmol/L 时, *let-7* 表

达量达到最大值, 是正常组的 3.6 倍( $P < 0.05$ )。在肾细胞中, 甲状腺激素 T3 可能通过甲状腺激素信号通路正向调控 *let-7* 的表达, 最适的浓度为 75 nmol/L, 其中具体的调控分子机制有待进一步的研究。

在动物中, 多数 miRNA 以不完全互补方式与其靶 mRNA 的 3'-UTR 的识别位点结合, 从而阻碍 mRNA 的翻译来调控基因表达<sup>[28-29]</sup>。每个 miRNA 都有数百个进化上保守的靶基因, 以及几倍的非保守的靶基因。miRNA 靶基因的鉴定已成为一个巨大的挑战, 在 miRNA 靶基因预测方面, 生物信息学已成为最主要的计算方法。这里预测的 29 个可能的 *let-7* 靶基因属于不同的基因家族(表 2), 其中多数靶基因是转录因子或与个体发育和信号转导有关的调控蛋白的编码基因, 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, 如 *Shh*、*Spaw* 编码的蛋白在左右不对称发育过程中起着重要的作用; *COL1A1*、*IGF-1* 等对应的蛋白在骨骼发育过程中有重要作用; *Decorin* 蛋白则与生物体的器官形成有关。*let-7* 靶标的广泛表达表明 *let-7* 能参加多样的生物学进程, 研究结果为牙鲆变态过程的生物学研究提供了新思路。

本研究首次克隆出牙鲆 *let-7* 基因及其前体序列, 分析发现, 不同物种间其前体的差异主要存在于环状结构区, 可能是进化过程中产生的差异。随后定量分析发现, *let-7* 表达量在发育末期达到峰值, 促进牙鲆从仔鱼向稚鱼的过渡。T3 影响了肾细胞中 *let-7* 的表达, T3 浓度为 75 nmol/L 时, 差异最显著。靶基因研究, *let-7* 通过作用于不同的基因, 参与多样的生物学过程。对 *let-7* 的研究为后续进一步研究 *let-7* 的功能以及对牙鲆变态发育的调控机理打下基础。

#### 参考文献:

- [1] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116: 281-297.
- [2] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *C.elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*[J]. Cell, 1993, 75(5): 843-854.
- [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] Griffiths-Jones S. miRBase: The microRNA sequence database[J]. Meth Molec Bio, 2006, 342: 129-138.
- [5] Grimson A, Farh K K, Johnston W K, et al. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing[J]. Mol Cell, 2007, 27: 91-105.
- [6] Martin B L, Kimelman D. Developmental biology: micro (RNA)-managing nodal[J]. Cur Biol, 2007, 17(22): R975-977.
- [7] Lynn F C. Meta-regulation: microRNA regulation of glucose and lipid metabolism[J]. Trends Endocrinol Metab, 2009, 20(9): 452-459.
- [8] Xiao C, Rajewsky K. MicroRNA control in the immune system: basic principles[J]. Cell, 2009, 136(1): 26-36.
- [9] Heyland A, Moroz L. Signaling mechanisms underlying metamorphic transitions in animals[J]. Integr Compara Biol, 2006, 46: 743-759.
- [10] Yamano K, Miwa S, Obinata T, et al. Thyroid hormone regulates developmental changes in muscle during flounder metamorphosis [J]. Gen Comp Endocrinol, 1991, 81: 464-472.
- [11] Yamano K, Takano-Ohmuro H, Obinata T, et al. Effect of Thyroid hormone on developmental transition of muosin light chains during flounder metamorphosis [J]. Gen Comp Endocrinol, 1994, 93: 321-326.
- [12] Miwa S, Inui Y. Thyroid hormones stimulates the shift of erythrocyte populations during metamorphosis of the flounder [J]. J Exp Zool, 1991, 259: 222-228.
- [13] Inui Y, Miwa S. Thyroid hormone induces metamorphosis of flounder larvae[J]. Gen Comp Endocrinol, 1985, 60: 450-454.
- [14] Caygill E E., Johnston L A. Temporal regulation of metamorphic processes in *Drosophila* by the *let-7* and miR-125 heterochronic microRNAs[J]. Curr Biol, 2008, 18: 943-950.
- [15] 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 Dev, 2008, 22: 1591-1596.
- [16] Lim L P, Lau N C, Weinstein E G, et al. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*[J]. Genes Dev, 2003, 17: 991-1008.
- [17] Amy E P, Brenda J R, Frank S, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA[J]. Nature, 2000, 408: 86-89.

- [18] Miwa S, Inui Y. Histological changes in the pituitary-thyroid axis during spontaneous and artificially-induced metamorphosis of larva of the flounder, *Paralichthys Olivaceus*[J]. Cell Tissue Res, 1987, 249: 117–123.
- [19] 田娟, 施志仪. 碱性磷酸酶在大菱鲆不同组织的表达及其与甲状腺激素的关系[J]. 中国水产科学, 2011, 18(1): 208–213.
- [20] Chen C, Ridzon D A, Broomer A J Z, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR[J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33: e179.
- [21] John B, Enright AJ, Aravin A, et al. Human MicroRNA targets[J]. PLoS Biol, 2004, 2: e363.
- [22] Rehmsmeier M, Steffen P, Hochsmann M, et al. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes[J]. RNA, 2004, 10: 1507–1517.
- [23] Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA[J]. Nature, 2000, 408: 86–89.
- [24] Moss EG. Heterochronic genes and the nature of developmental time[J]. Curr Biol, 2007, 17: R425–434.
- [25] Escriva H, Robinson M, Lauder V. Evolutionary biology of the nuclear receptor superfamily. In Nuclear Receptors[M]. A Practical Approach, Oxford: Oxford University Press. 1999: 1–28.
- [26] Chatterjee V K, Lee J K, Rentoumis A, et al. Negative regulation of the thyroid-stimulating[J]. Sci USA, 1989, 86: 9114–9118.
- [27] Power D M, Llewellyn L, Faustino M, et al. Thyroid hormones in growth and development of fish [J]. Com Biochem Physiol, Part C, 2001, 130: 447–459.
- [28] Standart N, Jackson RJ. MicroRNAs repress translation of m7Gppp-capped target mRNAs in vitro by inhibiting initiation and promoting deadenylation[J]. Genes Dev, 2007, 21: 1975.
- [29] Du T, Zamora PD. Beginning to understand microRNA function[J]. Cell Res, 2007, 17: 661.

## Cloning, expression and target gene prediction of *let-7* in *Paralichthys olivaceus* metamorphosis

SHI Zhiyi, WU Minglin, FU Yuanshuai

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

**Abstract:** The *let-7* gene is a critical regulator of developmental timing events of the larval-to-adult transition. Here, *Paralichthys olivaceus let-7* was identified by a stem-loop RT-PCR. The precursor of *let-7* was cloned and was proven to be highly conserved among different species. Quantitative analysis revealed that the expression levels of *let-7* were generally variably enhanced during the first five metamorphic stages and peaked during the late metamorphic stages (36 dph). At the end of *P. olivaceus* metamorphosis (41 dph), expression of *let-7* was reduced. To study the effects of triiodothyronine (T3) on the expression of *let-7*, six different concentrations (0 nmol·L<sup>-1</sup>, 50 nmol·L<sup>-1</sup>, 75 nmol·L<sup>-1</sup>, 100 nmol·L<sup>-1</sup>, 200 nmol·L<sup>-1</sup>) were used to treat *P. olivaceus* kidney cells *in vitro*. Quantitative PCR showed that *let-7* levels increased after T3 treatment, especially at 75 nmol·L<sup>-1</sup>, indicating that T3 regulated the expression of *let-7*. Further investigation of target genes demonstrated that the 3'-untranslated regions (3'-UTRs) of 29 mRNAs were possible target sites matched with *let-7*. These mRNA targets played key roles in diverse biological processes: development, cell proliferation, signal transduction, virus immune response, and signaling pathways. These results suggested that *let-7* played an essential role in regulating the developmental timing of *P. olivaceus* metamorphosis.

**Key words:** *Paralichthys olivaceus*; *let-7*; cloning and expression; metamorphosis; triiodothyronine (T3); target gene