

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.19166

Aja-miR-22 和 Aja-miR-27 及其靶基因在刺参盐度胁迫后的表达模式

郭然, 吴玮杰, 商艳鹏, 仇雪梅, 丁君, 李翔, 田焱

大连海洋大学, 农业农村部北方海水增殖重点实验室, 辽宁 大连 116223

摘要: 盐度是影响刺参(*Apostichopus japonicus*)生长发育最重要的环境因子之一, 而 microRNAs (miRNAs)可通过与靶基因的 mRNA 特异性结合, 实现对其靶基因的表达调控。为探究 Aja-miR-22 和 Aja-miR-27 及对应的两个靶基因在刺参低盐海水胁迫下的表达情况, 本实验将刺参放入盐度 18 低盐海水中进行胁迫, 取盐度胁迫后的 3 h、6 h、12 h、24 h、48 h 和 72 h 不同时间点和正常盐度海水中刺参的体腔液, 提取 RNA 和 miRNA, 利用 qRT-PCR 技术进行表达分析。结果表明 Aja-miR-22 和 Aja-miR-27 这两个 miRNA 在盐度胁迫后各时段均呈现出上调表达趋势, 且都在胁迫后 3 h 达到最大值, 分别为对照组的 36 倍和 16 倍。Aja-miR-22 和 Aja-miR-27 在胁迫后各个表达量都均高于对照组, 其中 Aja-miR-22 在胁迫后 3 h、48 h 与对照组差异极显著($P<0.01$), Aja-miR-27 在胁迫后 3 h、48 h、72 h 与对照组差异极显著($P<0.01$)。靶基因棘皮动物微管相关蛋白(77 kD echinoderm microtubule-associated protein)与一般转录因子 IIE 亚基 2 (general transcription factor IIE subunit 2)的表达趋势基本一致, 在胁迫后 3 h 降到最低值, 其中棘皮动物微管相关蛋白(EMAP)在胁迫后各个时间点表达量均低于对照组, 除胁迫后 48 h 外其余时间点均与对照组差异极显著($P<0.01$), 而一般转录因子 IIE 亚基 2 (general transcription factor IIE subunit 2)在胁迫后 48 h 和胁迫后 72 h 的表达量与对照组差异极显著($P<0.01$)。Aja-miR-22 和 Aja-miR-27 的表达趋势与其靶基因表达模式在 24 h 前均呈现负相关关系。上述研究结果说明 Aja-miR-22 和 Aja-miR-27 及其对应的靶基因在刺参的盐度适应调节机制中发挥作用。

关键词: 刺参; 盐度胁迫; miRNA 基因表达; 靶基因表达

中图分类号: S94; S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)04-0375-08

microRNAs (miRNAs)是一类长度为 18~26 nt 并能够调节转录后内源基因表达的非编码的小 RNA。目前已有报道刺参的 miRNA 与刺参夏眠^[1]、缺氧胁迫^[2]、腐皮疾病^[3]、肠再生^[4]、免疫调节^[5]等生理生化过程有关。Zhang 等^[6]在刺参体内体外的灿烂弧菌刺激实验中发现 miR-137 和 miR-2008 能够通过调节靶基因甜菜碱高半胱氨酸甲基转移酶(AjBHMT)进而促进 ROS 的产生和致病细菌的清除过程。Li 等^[7]通过实验转染 miR-210 模拟物证明其能够抑制 Toll 样受体基因(AjToll), 并且其

ROS 变化与 AjToll 的 siRNA 表现一致, miRNA-210 展示了一种新的免疫调节途径。Lu 等^[8]发现 miR-31 在调节刺参呼吸爆发时通过靶向作用于靶基因 Ajp105 来发挥作用。Shao 等^[9]研究结果证明在病原体和宿主之间的相互作用期间, miR-31 负向调节肿瘤坏死因子相关蛋白 9 (AjCTRP9)的表达, 从而导致半胱氨酸蛋白酶-3 和半胱氨酸蛋白酶-8 依赖性细胞凋亡。Lu 等^[10]通过转染 miR-133 模拟物和 si-AjIRAK-1 的结果表明 miR-133 参与 TLR 的级联调节, 并通过双荧光素酶确定了

收稿日期: 2019-06-09; 修订日期: 2019-07-12.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0901601).

作者简介: 郭然(1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向水产动物遗传育种与繁殖. E-mail: 605966912@qq.com

通信作者: 田焱, 副教授, 主要从事水产动物遗传育种研究. E-mail: tianyi@dlou.edu.cn

miR-133 和 AjIRAK-1 的靶向关系。Lv 等^[11]研究结果发现 miR-137 在海参发病机制中具有调节作用。Lv 等^[12]通过转染 miR-200 的模拟物分析靶基因 AjTollip 及其下游分子的表达,结果表明了 miR-200 能增强体细胞的抗菌活性。Zhang 等^[13]通过高通量测序和 PCR 筛选的方法确定了 miR-92a 的潜在靶基因 *SMURF* 和 *MEGF*。

盐度是影响刺参生理生态学最重要的环境因子之一。目前盐度对刺参影响的研究工作主要集中在刺参的生长^[14-15]、能量代谢^[15-16]和生理^[17]等方面。胡炜等^[14]将刺参置于盐度骤降的环境中,发现当盐度降低时会导致刺参的摄食率和食物转化率的下降。当养殖环境盐度在 31 时刺参对蛋白消化能力最强并且蛋白酶活力达到最高^[18-19]。董晓亮^[20]研究表明低盐条件对刺参的耗氧率、排氮率以及生长情况有着不同程度的影响。Zhang 等^[21]鉴定了刺参在低盐和高盐的环境中适应盐度变化的渗透特异性差异表达基因(DEG)。田焱等^[22]通过低盐胁迫条件下对 *DD104* 基因在仿刺参不同组织、时间的表达量变化规律分析,认为 *DD104* 基因可能与渗透胁迫密切相关。傅意然等^[23]通过低盐胁迫分析了 4 个基因定量表达变化,结果表明热休克蛋白 70 基因、甘氨酸转运蛋白基因、锌转运蛋白基因、神经乙酰胆碱受体基因在刺参盐度胁迫过程中发挥重要作用。Tian 等^[24-25]分析了溶菌酶基因在盐度胁迫下的表达变化及其溶菌酶基因干扰后的变化。目前已有研究表明盐度会影响刺参的生长发育及其生理活动^[24-25],但 microRNA 参与刺参盐度适应方面的相关研究结果相对较少。本文以低盐 18 psu 胁迫后的高通量测序结果为基础,从差异表达的 microRNA 中筛选出 Aja-miR-22 和 Aja-miR-27,预测获得其对应的靶基因,分析这两个 miRNA 及靶基因在盐度胁迫过程中的表达情况,为刺参的盐度适应过程提供重要的依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验刺参取自河北唐山海域,并暂养于大连海洋大学北方海水增养殖重点实验室,选择状态

良好、肉刺坚挺、湿重量为 (22.84 ± 2.79) g 的健康刺参作为实验材料。将 30 头刺参放置于盐度为 18 的低盐海水中进行低盐胁迫,在胁迫后的 3 h、6 h、12 h、24 h、48 h 和 72 h 不同时间段各自选取 3 头刺参的体腔液,用于后续实验分析。同时有正常盐度 32 的刺参作为对照组(0 h)。

1.2 实验方法

总 RNA 的提取以及 mRNA 的反转录和 qPCR 实验方法参照傅意然等^[23]的研究进行操作。

1.2.1 miRNA 的提取 采用 TRIzol 法提取 miRNA,并用 miRcute miRNA cDNA 第一链合成试剂盒(KR201)进行 miRNA 反转录。提取的 miRNA 首先进行加尾反应,以加尾后的 miRNA 作为模板进行反转录反应,反应体系为: RNA 2000 ng, 2×miRNA RT Reaction Buffer 10 μ L, miRNA RT Enzyme Mix 2 μ L,加 RNase-free ddH₂O 至 20 μ L。离心混匀后在 PCR 仪按照 42 $^{\circ}$ C, 1 h; 95 $^{\circ}$ C, 3 min 条件进行反转录。合成的 cDNA 反应液,通过琼脂糖凝胶电泳检测反转录的结果,放置于-20 $^{\circ}$ C 保存用于后续的定量表达分析。

1.2.2 miRNA 的靶基因预测 Aja-miR-22 和 Aja-miR-27 的靶基因是通过 miRanda 软件预测分析所得,根据 miRNA 与靶基因的序列匹配、miRNA-mRNA 双链之间的热稳定性和靶位点保守性为参数,检测到分数 $S > 90$ (单残基对分数)并且最小自由能低于-17 kCal/mol 的候选目标,被选作首选的靶基因作进一步分析。miRNA 5'端的第 2~8 个核苷酸作为核心种子序列,与靶 mRNA 特异性配对。前体 miRNA(pre-miRNA)切割形成的双链 miRNA 载入 AGO2 形成 RNA 诱导沉默复合物(RISC),最终 miRNA 中一条单链保留在复合物中,另一条链会降解。RISC 通过 miRNA 的 5'端与靶基因碱基配对实现识别结合目标。

引物的设计与荧光定量 PCR 反应从刺参盐度胁迫后 miRNA 的文库中选取存在显著差异表达的 2 个 miRNA(Aja-miR-22 和 Aja-miR-27)和对应的 2 个靶基因(*EMAP*, *gtf2e2*),通过普通 PCR 结合荧光定量 PCR 对引物进行筛选,获得特异性的引物。利用 Primer 5.0 软件对所选的 2 个基因设计荧光定量引物,引物是由上海生工生物工程股份有

限公司合成, 实验方法及步骤参考庚宸帆^[26]的方法。2 个 miRNA 和 2 个靶基因及内参基因的引物序列见表 1。

表 1 荧光定量 RT-PCR 引物序列
Tab. 1 Sequences of the qRT-PCR primers used in the experiment

基因 gene	引物序列 primer sequence
Aja-miR-22	TATTGCACTTGTCCCGGCCG
Aja-miR-27	CTATTGCACTTGTCCCGGCCTAT
U6	ACGCAAATTCGTGAAGCGTT
gtf2e2-F	5'-ACCAGTTGTGGAAGAAAAAGCC-3'
gtf2e2-R	5'-TAGTTGAAACCAGCCGGAGAGGAT-3'
EMAP-F	5'-CGCACCTAGCAAGACTCTAGCC-3'
EMAP-R	5'-AACGTCATCATTGTGACCCAAATA-3'
β -actin-F	5'-CGGCTGTGGTGGTGAAGGAGTA-3'
β -actin-R	5'-TCATGGACTCAGGAGACGGTGTG-3'

1.3 数据统计分析

所有数据均采用 SPSS22.0 软件进行分析, 并通过单因素方差分析(one-way ANOVA)和 LSD 比较数据差异显著水平, $P<0.05$ 时表示差异显著, 并采用 Origin8.1 软件绘制柱状图。

2 结果与分析

2.1 Aja-miR-22 和 Aja-miR-27 在盐度胁迫的表达

Aja-miR-22 和 Aja-miR-27 在盐度胁迫下各时段的表达结果如图 1 所示。Aja-miR-22 和 Aja-miR-27 这两个 miRNA 在盐度胁迫后各时段呈现相同的表达趋势, 2 个 miRNA 都呈现出上调表达, 且都在胁迫后 3 h 达到最大值, 分别为对照组的 36 倍和 16 倍。胁迫 3 h 后表达量有所降低, 在胁迫后 48 h 又开始升高, 然后降低。Aja-miR-22 和 Aja-miR-27 在胁迫后各个表达量都均高于对照组, 其中 Aja-miR-22 在胁迫后 3 h、48 h 与对照组差异极显著($P<0.01$), Aja-miR-27 在胁迫后 3 h、48 h、72 h 与对照组差异极显著($P<0.01$)。

2.2 靶基因在盐度胁迫下各时间段的表达

2 个靶基因棘皮动物微管相关蛋白(EMAP)和一般转录因子 IIE 亚基 2 (gtf2e2)的表达结果如图 2 所示。2 个靶基因的表达趋势基本一致, 在胁迫

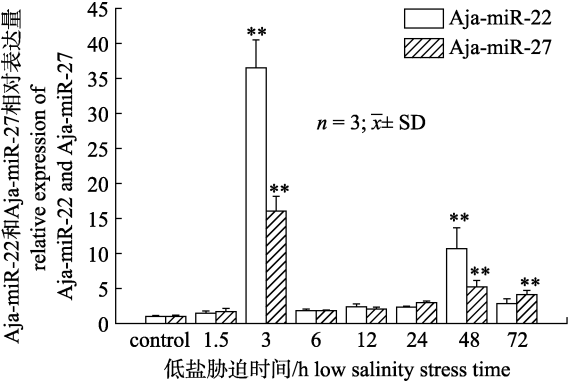


图 1 Aja-miR-22 与 Aja-miR-27 盐度胁迫后不同时间段的表达
“*”表示对照组与实验组之间差异显著($P<0.05$);
“***”表示对照组与实验组之间差异极显著($P<0.01$).
Fig. 1 Aja-miR-22 与 Aja-miR-27 expression profiles in different time under low salinity stress
“*” indicates the significant difference between the control and the experiment group ($P<0.05$); “***” indicates extremely significant difference between the control group and the experiment group ($P<0.01$).

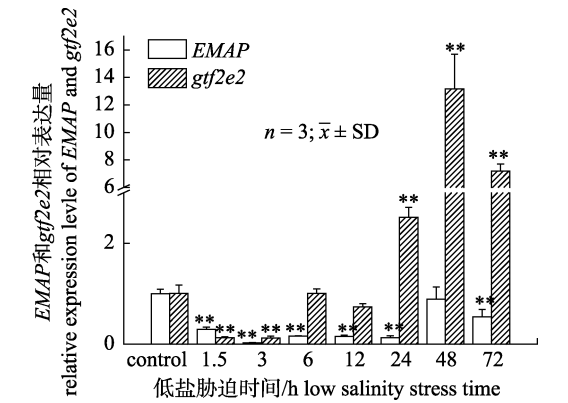


图 2 低盐胁迫下棘皮动物微管相关蛋白(EMAP)和一般转录因子 IIE 亚基 2 (gtf2e2)基因在不同时间段的表达
“*”表示对照组与实验组之间差异显著($P<0.05$);
“***”表示对照组与实验组之间差异极显著($P<0.01$).
Fig. 2 The endothelial monocyte-activating polypeptide and general transcription factor IIE subunit 2 gene expression in different time under low salinity stress
“*” indicates the significant difference between the control and the experiment group ($P<0.05$); “***” indicates extremely significant difference between the control group and the experiment group ($P<0.01$).

后 3 h 降到最低值, 是对照组的 89%, 然后开始逐渐升高, 至胁迫后 48 h 达到最大值, 是对照组的 13 倍。其中 EMAP 在胁迫后各个时间点的表达量均低于对照组, 除胁迫后 48 h 外, 其余时间点均与对照组差异极显著($P<0.01$)。而 gtf2e2 在胁迫后 1.5 h、3 h、24 h、48 h 和 72 h 的表达量与对照组

差异极显著($P < 0.01$)。

2.3 两个 miRNA 与其靶基因间 3'-UTR 区域结合

2 个 miRNA 及其靶基因间的 3'-UTR 区域序列对比如图 3 所示。Aja-miR-22 的“种子区”与 *EMAP* 3'-UTR 区域的 879~886 位点相结合, 序列对比得分 156.00 高于阈分数 90, 最小自由能 -19.51 kCal/mol, 得分数值越大或自由能越低都表明 miRNA 与靶 mRNA 结合复合物结构越稳定。

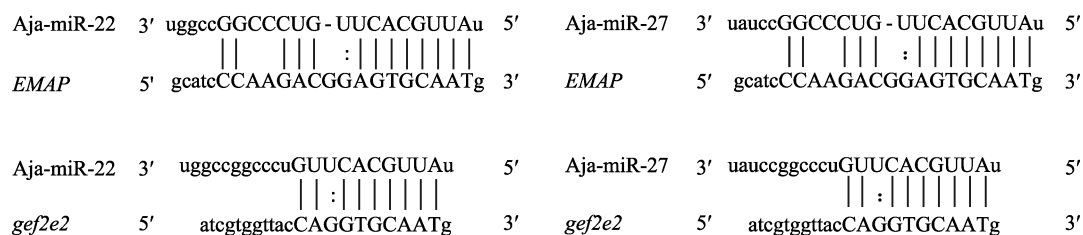


图 3 Aja-miR-22 与 Aja-miR-27 及其靶基因的 3'-UTR 区域序列对比

Fig. 3 Comparison of the 3'-UTR region sequences of Aja-miR-22 and Aja-miR-27 and their target genes

2.4 两个 miRNA 及其靶基因在低盐胁迫下不同时间段的表达

2 个 miRNA 与其对应靶基因的 mRNA 表达量如图 4 所示, 在盐度胁迫 24 h 内呈典型的负向调节趋势。Aja-miR-22 和 Aja-miR-27 表达趋势分别升高、降低、升高、降低, 与 *EMAP* 和 *gtf2e2* 的表达趋势分别降低、升高、降低、升高相反。在盐度胁迫 48 h 和 72 h 这两个时间点, *gtf2e2* 也

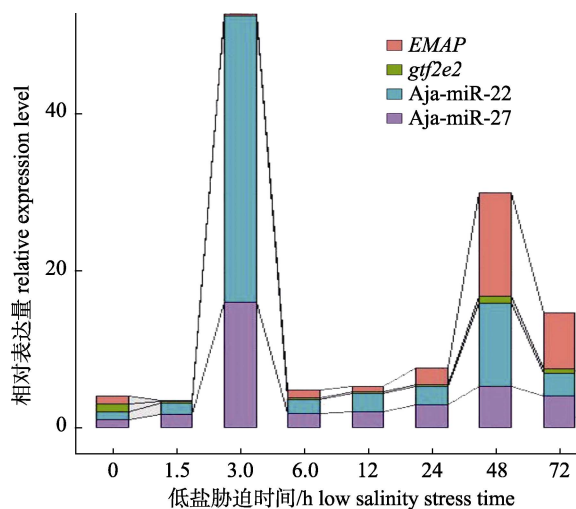


图 4 低盐胁迫下 Aja-miR-22 与 Aja-miR-27 不同时间段的表达趋势

Fig. 4 Expression of Aja-miR-22 and Aja-miR-27 in different periods under low salt stress

Aja-miR-22 的 2~12 位点与 *gef2e2* 的 493~514 位点序列对比得分 151.00, 最小自由能 -21.75 kCal/mol; Aja-miR-27 的 2~18 bp 与 *EMAP* 的 865~887 bp 序列对比得分 156.00, 最小自由能 -19.42 kCal/mol, Aja-miR-27 的“种子区”序列与 *EMAP* 3'-UTR 碱基完全互补; Aja-miR-27 的 2~12 bp 与 *gef2e2* 的 493~514 bp 序列对比得分 151.00, 最小自由能 -21.75 kCal/mol。

与 miRNA 呈现负向调节趋势, 而 *EMAP* 与其 miRNA 呈现正向的变化趋势。

3 讨论

miRNA 是一类高度保守的非编码 RNA, 能够在生物体中表达, 并通过与靶基因的完美或不完美互补性结合沉默靶基因, 调节基因的表达^[27-31]。在盐度胁迫相关的 miRNA 报道中, Wang 等^[32]在花鳗鲡(*Anguilla marmorata*)研究中发现 miR-10b-5p、miR-181、miR-26a-5p、miR-30d 和 miR-99a-5p 在 3 个盐度下呈现上调表达, 分析认为这 5 个 miRNA 在渗透调节中具有重要作用, 其中 miR-10b-5p 只有在海水盐度为 10 环境下参与鱼类渗透压的调控。Yan 等^[33]在尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)的渗透胁迫研究发现当渗透压逐渐升高, miR-429 的表达量下调与渗透胁迫转录因子 (*OSTF1*)表达量相应上调一致, 表明 miR-429 与 *OSTF1* 的靶向关系及其在渗透胁迫响应发挥重要作用。Yan 等^[34]也发现罗非鱼的 miR-30c 可以直接靶向调控 *HSP70* 基因, 通过抑制 miR-30c 的表达, 使鱼体血浆中的离子浓度升高, 表明 miR-30c 是参与罗非鱼体内渗透调节的重要物质。Flynt 等^[35]在斑马鱼(*Danio rerio*)中发现 miR-8 家

族的 miRNA 在离子细胞中表达丰富, 并通过调节钠氢交换调节因子(*Nherf1*)的表达来调控钠离子的转运, 从而保护胚胎细胞。在本文中刺参的 Aja-miR-22 和 Aja-miR-27 在盐度胁迫下 2 个 miRNA 都呈现出上调的表达趋势(图 1), 与上述 miRNA 研究结果一致, 说明这两个 miRNA 能够被盐度诱导表达, 并可能参与刺参的盐度调节适应过程, 还需要进一步的实验进行验证。2 个 miRNA 表达量的最大值出现在刺参盐度胁迫后的 3 h(图 1), 我们推测 miRNA 可能会在低盐应激的条件下做出相应的反应, 来更好地适应刺参体内的盐度变化带来的影响。miRNA 能够通过与靶基因的完美或不完美互补性结合直接沉默靶基因达到负向调节靶基因的作用^[36-37]。

miRNA 与靶基因在胁迫 24 h 内呈典型的负相关(图 4), 有很多报道也证实了 miRNA 与靶基因存在负向调节关系^[29-31], 在盐度胁迫 48 h 和 72 h 这两个时间点, *EMAP* 与其 miRNA 呈现正向的变化趋势。这种正向调节变化是一个值得关注的现象, 推测在盐度胁迫过程中, 除了 Aja-miR-22 和 Aja-miR-27 对 *EMAP* 有调控作用外, 可能在盐度胁迫后期还有其他的 miRNA 对 *EMAP* 具有调节作用, 也可能是 *EMAP* 在盐度胁迫过程中具有重要的作用, 需要 *EMAP* 高表达来更好地适应盐度胁迫对刺参机体内部变化的影响, 当然还需要进一步的实验进行验证。

微管相关蛋白(MAPS)是真核细胞中微管上的主要交感蛋白, 由于在海胆, 沙钱和海星中含量丰富, 被命名为棘皮动物微管相关蛋白^[38]。当胚胎细胞进入有丝分裂时期, *EMAP* 磷酸化程度增加, 并且随着胚胎有丝分裂结束, 其磷酸化会降低^[39]。Tabur 等^[40]通过与对照组的大麦分生细胞对比发现, 在 NaCl 含量为 0.30 mol/L、0.35 mol/L 和 0.40 mol/L 的培养基上生长的植物, 其有丝分裂指数呈显著降低。Kammerer 等^[41]在罗非鱼中证明了盐度变化能够增加富含线粒体细胞的有丝分裂。这些结果说明盐度变化对有丝分裂会产生一定影响, 进而影响 *EMAP* 磷酸化的过程。本实验中低盐胁迫后 *EMAP* 能够被诱导(图 2), 并且体

现差异表达趋势, 可能说明盐度胁迫可能导致细胞损伤, 需要启动有丝分裂过程来增加细胞的数量, 这个过程中需要 *EMAP* 的表达参与。生物体在环境胁迫下, 会需要启动一系列的蛋白质或酶类来协调机体对环境做出一定的反应, 这就需要启动基因的转录与表达过程。真核生物转录起始过程比较复杂, 至少存在 6 种蛋白质因子和 RNA 聚合酶 II 相互作用, 该系列因子统称为一般转录因子(GTF), 包括 TFIID、TFIIA、TFIIB、TFIIF、TFIIE、TFIIH^[42]。Drapkin 等^[43]结果证明 TFIIE 能够负调节 ERCC3 解旋酶活性; Guzder 等^[44]在酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中证明了 TFIIE 对 ERCC3 解旋酶活性的负向调节是 RNAPII 转录所必需的。He 等^[45]在小麦中证明了转录因子 *TaMYB73* 基因能够改善离子抗性并在盐度耐受性方面发挥了重要作用。Hu 等^[46]在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中证明转录因子 WRKY8 的抑制因子 VQ9 蛋白可以通过维持 *W* 的盐度胁迫后的适应过程, 同时在这个过程中有 miRNA 参与其过程, 并且在一定时间段内靶基因和 miRNA 还存在一定程度的负相关(图 4), 可能说明 miRNA 和对应的靶基因均需要通过调整其表达丰度来参与刺参的盐度适应过程。

参考文献:

- [1] Chen M Y, Storey K B. Large-scale identification and comparative analysis of miRNA expression profile in the respiratory tree of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* during aestivation[J]. Marine Genomics, 2014, 13: 39-44.
- [2] Huo D, Sun L N, Li X N, et al. Differential expression of miRNAs in the respiratory tree of the Sea cucumber *Apostichopus japonicus* under hypoxia stress[J]. G3: Genes Genomes Genetics, 2017, 7(11): 3681-3692.
- [3] Li C H, Feng W D, Qiu L H, et al. Characterization of skin ulceration syndrome associated microRNAs in sea cucumber *Apostichopus japonicus* by deep sequencing[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 33(2): 436-441.
- [4] Sun L N, Sun J C, Li X N, et al. Understanding regulation of microRNAs on intestine regeneration in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* using high-throughput sequencing[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 2017, 22: 1-9.
- [5] Zhong L, Zhang F, Zhai Y, et al. Identification and compara-

- tive analysis of complement C3-associated microRNAs in immune response of *Apostichopus japonicus* by high-throughput sequencing[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 17763.
- [6] Zhang P J, Li C H, Zhang R, et al. miR-137 and miR-2008 modulate ROS production in the bacterial-challenged sea cucumber *Apostichopus japonicus* via combinatorially targeting betaine-homocysteine S-methyltransferase in vitro and in vivo[J]. Genetics, 2015, 201(4): 1397-1410.
- [7] Li C H, Zhao M R, Zhang C, et al. miR210 modulates respiratory burst in *Apostichopus japonicus* coelomocytes via targeting Toll-like receptor[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2016, 65: 377-381.
- [8] Lu M, Zhang P J, Li C H, et al. MiR-31 modulates coelomocytes ROS production via targeting p105 in *Vibrio splendidus* challenged sea cucumber *Apostichopus japonicus* in vitro and in vivo[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 45(2): 293-299.
- [9] Shao Y N, Li C H, Xu W, et al. miR-31 links lipid metabolism and cell apoptosis in bacteria-challenged *Apostichopus japonicus* via targeting CTRP9[J]. Frontiers in Immunology, 2017, 8: 263.
- [10] Lu M, Zhang P J, Li C H, et al. miRNA-133 augments coelomocyte phagocytosis in bacteria-challenged *Apostichopus japonicus* via targeting the TLR component of IRAK-1 in vitro and in vivo[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 12608.
- [11] Lv M, Chen H H, Shao Y N, et al. miR-137 modulates coelomocyte apoptosis by targeting 14-3-3 ζ in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2017, 67: 86-96.
- [12] Lv Z, Li C H, Zhang P J, et al. miR-200 modulates coelomocytes antibacterial activities and LPS priming via targeting Tollip in *Apostichopus japonicus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 45(2): 431-436.
- [13] Zhang P J, Li C H, Shao Y N, et al. Identification and characterization of miR-92a and its targets modulating *Vibrio splendidus* challenged *Apostichopus japonicus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 38(2): 383-388.
- [14] Hu W, Li C L, Zhao B, et al. Effects of low salinity stress on survival, growth and feeding rate of sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2012, 33(2): 92-96. [胡炜, 李成林, 赵斌, 等. 低盐胁迫对刺参存活、摄食和生长的影响[J]. 渔业科学进展, 2012, 33(2): 92-96.]
- [15] Kim T I, Park M W, Cho J K, et al. Survival and histological change of integumentary system of the juvenile sea cucumber, *Apostichopus japonicus* exposed to various salinity concentrations[J]. Journal of Fisheries and Marine Sciences Education, 2013, 25(6): 1360-1365.
- [16] Yuan X T, Yang H S, Wang L L, et al. Effects of aestivation on the energy budget of sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) (Echinodermata: Holothuroidea)[J]. Acta Ecologica Sinica, 2007, 27(8): 3155-3161.
- [17] Geng C F, Tian Y, Shang Y P, et al. Effect of acute salinity stress on *Ion* homeostasis, Na⁺/K⁺-ATPase and histological structure in Sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. SpringerPlus, 2016, 5: 1977.
- [18] Han X D, Yu S S, Liu Y Y, et al. Effects of salinity on protein intake and protease activity of *Apostichopus japonicus*[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2017, 56(6): 1096-1098. [韩晓弟, 于珊珊, 刘莹莹, 等. 盐度对仿刺参蛋白摄入量及蛋白酶活性的影响[J]. 湖北农业科学, 2017, 56(6): 1096-1098.]
- [19] Wang G L, Zhu W X, Li Z Z, et al. Effects of water temperature and salinity on the growth of *Apostichopus japonicus*[J]. Shandong Science, 2007, 20(3): 6-9. [王国利, 祝文兴, 李兆智, 等. 温度与盐度对刺参(*Apostichopus japonicus*)生长的影响[J]. 山东科学, 2007, 20(3): 6-9.]
- [20] Dong X L. Ecological and physiological effects on low salt stress in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*)[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013. [董晓亮. 低盐胁迫对刺参(*Apostichopus japonicus*)生理生态学影响的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.]
- [21] Zhang L B, Feng Q M, Sun L N, et al. Differential gene expression in the intestine of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) under low and high salinity conditions[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 2018, 25: 34-41.
- [22] Tian Y, Mo H B, Chang Y Q. Expression of *DD104* gene in sea cucumber *Apostichopus japonicus* under salinity stress[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2013, 28(3): 236-240. [田隼, 莫海波, 常亚青. 低盐胁迫下仿刺参 *DD104* 基因的定量表达分析[J]. 大连海洋大学学报, 2013, 28(3): 236-240.]
- [23] Fu Y R, Tian Y, Chang Y Q, et al. Expression of genes involved in salinity regulation in sea cucumber, *Apostichopus japonicus* under low salinity stress[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(5): 902-909. [傅意然, 田隼, 常亚青, 等. 低盐胁迫对刺参 4 个盐度调节相关基因表达丰度的影响[J]. 中国水产科学, 2014, 21(5): 902-909.]
- [24] Tian Y, Jiang Y N, Shang Y P, et al. Establishment of lysozyme gene RNA interference system and its involvement in salinity tolerance in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 65: 71-79.
- [25] Tian Y, Liang X W, Chang Y Q, et al. Expression of c-type

- lysozyme gene in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) is highly regulated and time dependent after salt stress[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2015, 180: 68-78.
- [26] Geng C F. Analysis on salinity related genes expression and histological structure of *Apostichopus japonicus*[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2016. [庚宸帆. 刺参盐度调节相关基因的定量表达及组织学分析[D]. 大连: 大连海洋大学, 2016.]
- [27] Jonas S, Izaurralde E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing[J]. Nature Reviews Genetics, 2015, 16(7): 421-433.
- [28] 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.
- [29] Bartel D P. microRNAs: Target recognition and regulatory functions[J]. Cell, 2009, 136(2): 215-233.
- [30] Tarver J E, Sperling E A, Nailor A, et al. miRNAs: small genes with big potential in metazoan phylogenetics[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(11): 2369-2382.
- [31] Taylor R S, Tarver J E, Hiscock S J, et al. Evolutionary history of plant microRNAs[J]. Trends in Plant Science, 2014, 19(3): 175-182.
- [32] Wang X L, Yin D Q, Li P, et al. microRNA-sequence profiling reveals novel osmoregulatory microRNA expression patterns in catadromous eel *Anguilla marmorata*[J]. PLoS ONE, 2015, 10(8): e0136383.
- [33] Yan B, Zhao L H, Guo J T, et al. miR-429 regulation of osmotic stress transcription factor 1 (OSTF1) in tilapia during osmotic stress[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012, 426(3): 294-298.
- [34] Yan B, Guo J T, Zhao L H, et al. MiR-30c: A novel regulator of salt tolerance in tilapia[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012, 425(2): 315-320.
- [35] Flynt A S, Thatcher E J, Burkewitz K, et al. miR-8 microRNAs regulate the response to osmotic stress in zebrafish embryos[J]. The Journal of Cell Biology, 2009, 185(1): 115-127.
- [36] Bartel D P. microRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [37] Ji W Y, Fu Y S, Shi Z Y, et al. Expression of miR-124 and Otx2 during metamorphosis and verification of their targeting relationship in *Paralichthys olivaceus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2019, 26(6): 1040-1048. [季文瑶, 付元帅, 施志仪, 等. miR-124 和 Otx2 在牙鲆变态发育期间的表达调控及其靶向关系验证[J]. 中国水产科学, 2019, 26(6): 1040-1048.]
- [38] Suprenant K A, Dean K, McKee J, et al. EMAP, an echinoderm microtubule-associated protein found in microtubule-ribosome complexes[J]. Journal of Cell Science, 1993, 104(2): 445-450.
- [39] Brisch E, Daggett M A, Suprenant K A. Cell cycle-dependent phosphorylation of the 77 kDa echinoderm microtubule-associated protein (EMAP) in vivo and association with the p34cdc2 kinase[J]. Journal of Cell Science, 1996, 109(12): 2885-2893.
- [40] Tabur S, Demir K. Cytogenetic response of 24-epibrassinolide on the root meristem cells of barley seeds under salinity [J]. Plant Growth Regulation, 2009, 58(1): 119-123.
- [41] Kammerer B D, Sardella B A, Kultz D. Salinity stress results in rapid cell cycle changes of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) gill epithelial cells[J]. Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology, 2009, 311A(2): 80-90.
- [42] Zawel L, Reinberg D. Initiation of transcription by RNA polymerase II: A multi-step process[J]. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, 1993, 44: 67-108.
- [43] Drapkin R, Reinberg D. The multifunctional TFIIF complex and transcriptional control[J]. Trends in Biochemical Sciences, 1994, 19(11): 504-508.
- [44] Guzder S N, Sung P, Bailly V, et al. RAD25 is a DNA helicase required for DNA repair and RNA polymerase II transcription[J]. Nature, 1994, 369(6481): 578-581.
- [45] He Y N, Li W, Lv J, et al. Ectopic expression of a wheat MYB transcription factor gene, TaMYB73, improves salinity stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(3): 1511-1522.
- [46] Hu Y R, Chen L G, Wang H P, et al. *Arabidopsis* transcription factor WRKY8 functions antagonistically with its interacting partner VQ9 to modulate salinity stress tolerance[J]. The Plant Journal, 2013, 74(5): 730-745.

Expression profiles of Aja-miR-22 and Aja-miR-27, and their target genes, in sea cucumber under salinity stress

GUO Ran, WU Weijie, SHANG Yanpeng, QIU Xuemei, DING Jun, LI Xiang, TIAN Yi

Key Laboratory of Mariculture & Stock Enhancement in North China's Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Dalian Ocean University, Dalian 116223, China

Abstract: Salinity is one of the most important environmental factors affecting the growth and development of sea cucumbers. microRNAs (miRNAs) can regulate the expression of their target genes by specifically binding to target mRNA. The expression profiles of Aja-miR-22 and Aja-miR-27, and two target genes, were detected in sea cucumbers that were under low salt stress. RNA and miRNA were extracted from coelomocytes of sea cucumbers in normal salinity seawater and were, after 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, and 72 h exposure to salinity stress, analyzed by qRT-PCR. The results showed that the expression profile of Aja-miR-22 was consistent with that of Aja-miR-27 at each time point after initial salinity stress. Two miRNAs were induced to up-regulate and reached maximum expression at 3 h after stress. The expression maximums of Aja-miR-22 and Aja-miR-27 were 36 times and 16 times more than in the control group, respectively. The expression levels of Aja-miR-22 and Aja-miR-27 were higher than those of the control group under salinity stress, and Aja-miR-22 was significantly different from the control group at 3 h and 48 h after initial stress exposure ($P < 0.01$). Aja-miR-27 was significantly different from the control group at 3 h, 48 h, and 72 h under salinity stress. The expression of the target gene echinoderm microtubule-associated protein (EMAP; 77 kD) was also consistent with the general transcription factor IIE subunit 2, which reached the minimum value at 3 h under salinity stress. The expression level of EMAP was lower than that of the control group at each time point after salinity stress. The general transcription factor IIE subunit 2 (General Transcription Factor IIE Subunit 2) was significantly different from the control group at 48 h and 72 h under salinity stress ($P < 0.01$). The expression trends of Aja-miR-22 and Aja-miR-27 were negatively correlated with their target gene expression patterns before 24 h. The above results indicated that Aja-miR-22 and Aja-miR-27, and their corresponding target genes, are involved in the salinity adaptation mechanism of sea cucumber.

Key words: *Apostichopus japonicus*; salinity stress; miRNA expression; targeted genes expression

Corresponding author: TIAN Yi. E-mail: tianyi@dlou.edu.cn