

文章编号: 1674 - 5566(2012)05 - 0671 - 08

日本文昌鱼雄性高表达 miRNA 的筛选与鉴定

江守文¹, 戴中华², 陈良标², 许强华^{1,3,4,5}

(1. 上海海洋大学 海洋科学学院, 上海 201306; 2. 中国科学院 遗传与发育生物学研究所, 北京 100101; 3. 上海海洋大学 大洋渔业资源可持续开发省部共建教育部重点实验室, 上海 201306; 4. 农业部大洋渔业资源环境科学观测实验站, 上海 201306; 5. 国家远洋渔业工程技术研究中心, 上海 201306)

摘要: MicroRNA (miRNA) 是真核生物中长度约为 22 个核苷酸的非编码小分子 RNA, 在基因表达调控中扮演重要角色。雌雄差异 miRNA 的筛选将有助于研究性腺发育的分子机制。通过分离日本文昌鱼 (*Branchiostoma japonicum*) 精巢和卵巢的小 RNA, 利用 miRNA 芯片杂交的方法, 从文昌鱼的小 RNA 文库中筛选出 36 个日本文昌鱼性腺高表达的 miRNA, 其中 11 个 miRNA 在文昌鱼精巢中呈显著差异表达。6 个文昌鱼特有的 miRNA (bfl-miR-92b, bfl-miR-10A06, bfl-miR-281, bfl-miR-36B03, bfl-miR-29B02 和 bfl-miR-26A01) 在雌雄性腺中呈现差异表达, 其中 4 个 miRNA 为雄性高表达, 2 个 miRNA 为雌性高表达。利用 RT-qPCR 验证了 bfl-miR-92b, bfl-miR-10A06, bfl-miR-281 和 bfl-miR-36B03 这 4 个文昌鱼特有的 miRNA 在精巢中的丰富表达。这些研究结果为文昌鱼雌雄差异 miRNA 的功能研究奠定了重要基础。

研究亮点: 本文针对头索类动物日本文昌鱼, 利用 miRNA 芯片杂交技术筛选出 36 个性腺高表达的 miRNA, 从中获得 11 个雌雄性腺显著差异表达的 miRNA, 并且首次鉴定出文昌鱼特有的 4 个在精巢中丰富表达的 miRNA (bfl-miR-92b, bfl-miR-10A06, bfl-miR-281 和 bfl-miR-36B03)。这些研究结果将为文昌鱼雌雄差异 miRNA 的功能研究奠定重要的基础。

关键词: 文昌鱼; microRNA; 性腺; miRNA 芯片; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: S 917

文献标志码: A

MicroRNA (miRNA) 是真核生物中一类长度约为 22 个核苷酸的非编码小分子 RNA。它们能够通过和靶 mRNA 特异性结合引起靶 mRNA 的降解或者抑制其翻译而在动植物基因表达调控中扮演重要角色^[1]。越来越多的研究表明 miRNA 分子广泛参与细胞增殖、分化、凋亡、信号转导、器官形成、胚胎发育、肿瘤发生等多种细胞生命活动进程的调控^[2-4], 这些发现表明 miRNA 在高等生物的基因表达调控中起到重要的作用。

MiRNA 在物种进化中非常保守, 在植物、动物及真菌中发现的 miRNA 都是受到细胞类型和分化阶段严格调控的, 只在特定的组织和发育阶段中表达^[5]。这种表达的组织特异性和时序性, 表明它们可能决定着组织和细胞的功能特异性。

miRNA 在哺乳动物中的表达具有组织和时序特异性, 运用高通量的 miRNA 芯片杂交技术发现: 在人和小鼠的睾丸组织中有许多睾丸组织丰富表达的 miRNA 分子。如 mmu-miR-449a, mmu-miR-465c, mmu-miR-202, mmu-miR-547, mmu-miR-881 在小鼠睾丸组织呈特异性丰富表达; mmu-miR-449a, hsa-miR-892b, hsa-miR-202 等在人睾丸中呈特异丰富表达^[6]。另外, 如 mir-34, mir-469, mir-465, mir-101 等则随小鼠睾丸的发育表现上调或下调^[7]。研究证明: miRNA 在精子的生成^[8], 受精卵的发育^[9-11], 配子的分化^[12], 以及睾丸生殖细胞肿瘤的形成^[13-14] 等起到重要的调控作用。

文昌鱼在进化上占有极其重要的地位, 是介

收稿日期: 2012-04-28 修回日期: 2012-05-18

基金项目: 国家海洋 863 计划项目(2008AA092602)

作者简介: 江守文(1985—), 男, 硕士研究生, 研究方向为海洋生物分子遗传学。E-mail: aqjiangshouwen@126.com

通讯作者: 许强华, E-mail: qhxu@shou.edu.cn

于低等无脊椎动物和脊椎动物之间的过渡类型^[15]。文昌鱼因其身体构造简单,基本躯体构成与脊椎动物相同,与脊椎动物有很强的可比性;此外,它具有体型小,皮肤透明,肉眼即可观察性腺等内部器官的发育等特征;加上文昌鱼性腺中的精、卵细胞发育比较同步,因此成为基因功能研究、进化发育研究的模式动物^[16-17]。本研究借助 miRNA 芯片技术,从日本文昌鱼性腺中筛选出雌雄差异表达的 miRNA,试求找出文昌鱼精巢中丰富表达的 miRNA。头索类动物文昌鱼雌雄差异 miRNA 的筛选,将有助于推动脊椎动物的性别决定和性腺发育机制、生殖细胞肿瘤及生育障碍等疾病的研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

文昌鱼样本采集于厦门文昌鱼自然保护区内的黄厝、欧厝南线及蟹口等海区,采集之后运回实验室。按 ZHANG 等^[18]分类学鉴定标准对种进行鉴定,筛选鉴定出日本文昌鱼样本,保存至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

总蛋白提取试剂盒购自北京华大蛋白公司。mirVana^(TM) miRNA Isolation 10 ~ 40 iso(试剂)及 Poly(A) Polymerase 80 U ($2\text{ U}/\mu\text{L}$) (试剂)购自 ambion 公司。Faststart Universal SYBR Green Master (Rox) 购于 Roche 公司。RTase M-MLV (RNase H⁻) ($200\text{ U}/\mu\text{L}$) 购自 TaKaRa 公司,引物由上海生工公司合成。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的抽提及小分子 RNA 的分离与纯化

用解剖针分别刮取雌、雄性日本文昌鱼的卵巢和精巢组织。用 Trizol 试剂提取各发育阶段卵巢和精巢的总 RNA。将提取的总 RNA 用 mirVana^(TM) miRNA Isolation kit (Ambion, AM1561) 分离出小于 200 nt 的小分子 RNA,方法参照 Kit 说明书。取 $25\text{ }\mu\text{L}$ (约 $2\text{ }\mu\text{g}$) 小 RNA ($< 200\text{ nt}$), 在 $1\times\text{ PAP buffer}$, 2.5 mmol/L MnCl_2 , 1 mmol ATP , $2\sim 8\text{ U Poly(A)}$ (Ambion, AM2030), RNase inhibitor 的反应体系中 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 哺育 1 h 加 Poly(A) 尾。反应产物用酚/氯仿/异戊醇抽提两次,加入 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠, $4\text{ }\mu\text{L}$ 核酸共沉剂, 2.5 倍体积的无水乙醇, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜沉

淀, $15\text{ }000\text{ r/min}$ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min 收集沉淀,用 $20\text{ }\mu\text{L DEPC}$ 处理的 H_2O 溶解沉淀。

1.2.2 miRNA 芯片的制备与数据分析

文昌鱼卵巢和精巢的总 RNA 用华大总 RNA 提取试剂盒提取。避免其他 RNA 对芯片杂交的影响,每个样品取 $50\text{ }\mu\text{g}$ 总 RNA 用 PEG^[19] 方法富集含有 miRNA 的低分子量 RNA。利用 T₄ RNA 连接酶标记方法^[19] 进行荧光标记,然后再用无水乙醇沉淀,吹干后用于芯片杂交。哺乳动物 miRNA 芯片 V3.0 (博奥,北京) 含有针对人、小鼠和鱼 miRNA (sanger miRbase release 10.0) 的 924 条探针,并含有针对文昌鱼合成的 114 条探针。在芯片上还有针对作为内标的 U6、tRNA 的探针,作为外标的 8 个人工制备的 30 个碱基长度 RNA 的探针,作为点样阳性对照的 Hex 和作为杂交阴性对照的 50% DMSO。芯片用 LuxScan 10 K/A 双通道激光扫描仪 (博奥公司) 进行扫描。

采用 LuxScan3.0 图像分析软件 (博奥公司) 对芯片图像进行分析,把图像信号转化为数字信号。根据校正后的数据计算出每个样品每一 miRNA 的平均荧光值,用 Gene cluster 3.0 软件进行层次聚类分析,找出组织特异表达 miRNA。

1.2.3 cDNA 的合成和荧光定量 RT-PCR

以特殊的 oligo dT [5'-ATTCTAGAGCCGAG CCGCCGACATGT(24) VN-3'] 为引物逆转录已加尾的小分子 RNA。逆转录实验参照 RTase M-MLV (RNase H⁻) kit (TaKaRa, D2639A) 的说明书。PCR 扩增以序列和 miRNA 序列一致的 oligo DNA 为上游引物,以与逆转录引物 5' 端互补配对的长度为 20nt 的 oligo DNA 为下游引物,使用 LA Taq 酶扩增,产物经 4% 的琼脂糖电泳分析。miRNA 的 RT-qPCR 方法参照 CHEN 等^[20] 的方法,使用荧光实时定量 PCR 仪 (C 1000TM Thermal Cycler, BIO-RAD) 进行反应,反应程序按 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退温 15 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s, 45 个循环进行实时荧光定量扩增。相应的 PCR 引物见表 1。

每个样品,每个基因做 3 次重复实验,采用 U6 snRNA 作为内参,进行归一化分析。

2 结果

2.1 总 RNA 的质量鉴定结果

日本文昌鱼样品总 RNA 的提取结果如图 1 所示。经紫外分光光度计测定,其 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 的

值在 1.8~2.0 之间,琼脂糖凝胶电泳结果条带锐利清晰,28S 与 18S 的比值接近 2:1, RNA 基本无降解。质量符合后续 RT-PCR 等实验的要求。经 mirVana^(TM) miRNA Isolation kit 的分离,分别获得雌雄文昌鱼卵巢、精巢的小分子 RNA。

表 1 miRNA 实时定量 RT-PCR 的引物

Tab.1 Primers used to perform RT-PCR of miRNAs

miRNA	引物方向	核苷酸序列(5'-3')
bfl-miR-10A06	Forward	CAAATCACTTCAGTGCAGTTCTC
bfl-miR-36B03	Forward	AAGCAGCAGTGTGCAGTGGTGA
bfl-miR-281	Forward	TGTCATGGAGTTGCTCTCTTTT
bfl-miR-92b	Forward	CATTGCACTCGTCCCGGCTGA
U6 RNA	Forward	TTGCCCACTGAGCGTAAA
universal	Reverse	ATTCTAGAGCCGAGCGCCGACA TGT(24)VN

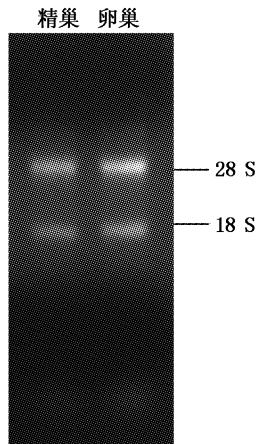


图 1 文昌鱼精巢、卵巢组织总 RNA 电泳图
Fig.1 Electrophoregram of total RNA
of the amphioxus testis and ovary

2.2 文昌鱼精巢、卵巢 miRNA 的差异表达

文昌鱼精巢、卵巢小分子 RNA 与芯片杂交,杂交芯片经过扫描和数据整理后应用 cluster 和 SAM 软件输出,得到 miRNA 表达谱(图 2)。

判断一个 miRNA 是否在文昌鱼卵巢或精巢中表达的依据是该 miRNA 在同一组织的两个样品中都表达(信号值 >400),只要 miRNA 在卵巢和精巢样品中的表达信号值大于 400 就认为在该组织中表达。这样,我们一共鉴定出 36 个在文昌鱼性腺中表达的 miRNA。其中,有 16 个 miRNA (bfl-miRNA)是文昌鱼特有的 miRNA(表 2)。

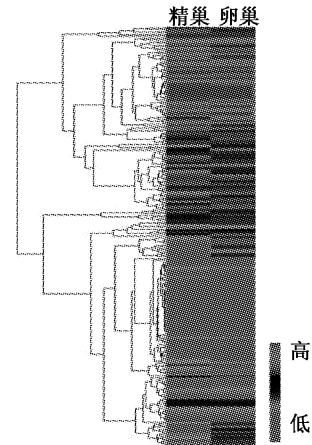


图 2 文昌鱼精巢和卵巢的 miRNA 芯片数据聚类图
Fig.2 Clustering analysis of miRNAs
of the amphioxus testis and ovary

表 2 文昌鱼性腺中表达的 miRNA

Tab.2 miRNAs expressed in amphioxus gonad

miRNA 名称	文昌鱼精巢	文昌鱼卵巢
hsa-miR-29b	17 449	4 010
bfl-miR-92b	31 299	14 840
mmu-miR-217	16 775	7 045
hsa-miR-217	11 737	4 824
bfl-miR-10A06	514	5
bfl-miR-281	1 239	208
bfl-miR-36B03	2 706	940
hsa-let-7a	23 418	24 150
dma-miR-22a	891	616
bfl-miR-27G10	1 312	1 320
bfl-miR-665	1 370	2 214
dma-miR-125a	3 383	3 458
bfl-miR-34H10	6 515	3 897
hsa-miR-22	10 467	6 556
hsa-miR-100	7 809	10 956
hsa-miR-99a	6 101	11 249
hsa-miR-92a	27 266	11 738
hsa-miR-125a-5p	10 293	14 272
dma-miR-37H12	23 949	17 361
hsa-miR-125b	19 022	25 450
hsa-miR-10a	4 261	5 273
hsa-miR-133a	999	938
hsa-miR-200a	2 032	1 302
hsa-miR-210	18 655	9 789
hsa-miR-31	16 183	17 183
mmu-miR-429	1 879	1 218
bfl-miR-01D02	697	1 304
hsa-miR-99b	722	1 671
bfl-miR-26D11	2 082	2 457
bfl-miR-29B02	190	667
bfl-miR-26A01	153	1 213
bfl-miR-26G03	760	388
bfl-miR-06F04	884	1 078
bfl-miR-06F07	2 071	1 461
bfl-miR-39G05	3 136	1 620
bfl-miR-71c	1 637	1 592

注:表中 hsa 等为物种拉丁文缩写,对应各物种为 hsa 表示 *H. sapiens*; mmu 表示 *mus musculus*; bfl 表示 *B. floridae*; dma 表示 *D. mausoni*;粗体表示文昌鱼雌雄性腺中的表达差异显著(大于 2 倍的倍性差异)的 miRNA。

比较 microarray 数据中文昌鱼雌雄性腺 miRNA 的表达谱发现,一些 miRNA,如 let-7a, miR-133a 等在文昌鱼精巢和卵巢中表达水平基本持平,无显著差异。而 11 个 miRNA (hsa-miR-29b, bfl-miR-92b, mmu-miR-217, hsa-miR-217, bfl-miR-10A06, bfl-miR-281, bfl-miR-36B03, hsa-miR-92a, hsa-miR-99b, bfl-miR-29B02 和 bfl-miR-26A01) 在文昌鱼雌雄性腺中的表达差异显著(大于 2 倍的倍性差异,表 2 和图 3)。6 个文昌鱼特有的 miRNA (bfl-miR-92b, bfl-miR-10A06, bfl-miR-281, bfl-miR-36B03, bfl-miR-29B02 和 bfl-miR-26A01) 在雌雄性腺中呈现差异表达,其中的

4 个 miRNA (bfl-miR-92b, bfl-miR-10A06, bfl-miR-281 和 bfl-miR-36B03) 表现出精巢高表达,2 个 miRNA (bfl-miR-29B02 和 bfl-miR-26A01) 在卵巢中呈现高表达(表 2,图 3)。

2.3 RT-PCR 及实时荧光定量 PCR

针对芯片杂交筛选出来的文昌鱼特有的雄性高表达 miRNA (bfl-miR-92b, bfl-miR-10A06, bfl-miR-281, bfl-miR-36B03), 我们用 U6 RNA 做内参,通过 RT-PCR 扩增,结果显示:该 4 个 miRNA 在文昌鱼精巢和卵巢中的表达与芯片杂交的结果一致(图 4),都表现为在精巢中的表达比卵巢高。

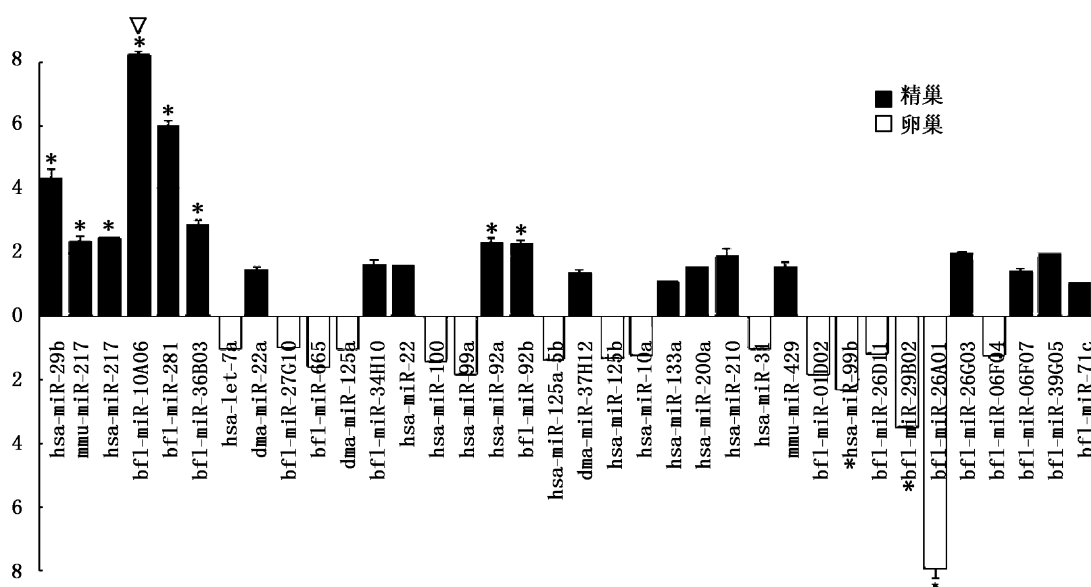


图 3 miRNA 在精卵巢中表达的倍性关系

Fig. 3 Fold relationship of miRNA between the amphioxus testis and ovary

* 表示文昌鱼雌雄性腺中的表达差异显著(大于 2 倍的倍性差异)的 miRNA;▽表示 bfl-miR-10A06 在雌雄性腺中的表达差异极其显著,大于 100 倍的倍性差异。

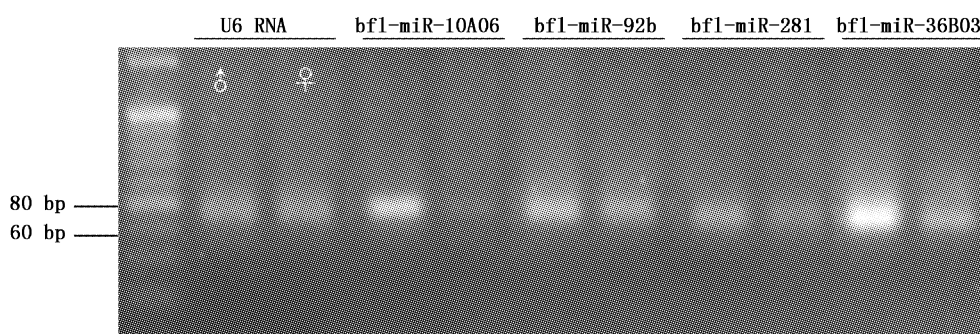


图 4 miRNA 在文昌鱼精巢、卵巢中的 RT-PCR

Fig. 4 RT-PCR analysis of miRNAs of the amphioxus different gonad

另外,针对芯片杂交筛选出来的文昌鱼特有的雄性高表达 miRNA (bfl-miR-92b, bfl-miR-10A06, bfl-miR-281, bfl-miR-36B03),本实验采用实时荧光定量 RT-PCR 技术检测了它们在精巢和

卵巢组织表达情况。采用 U6snRNA 进行归一化。4 个 miRNAs 定量 RT-PCR 扩增曲线和熔解曲线见图 5,显示 4 个 miRNA 熔解曲线呈单峰,引物的特异性较好。

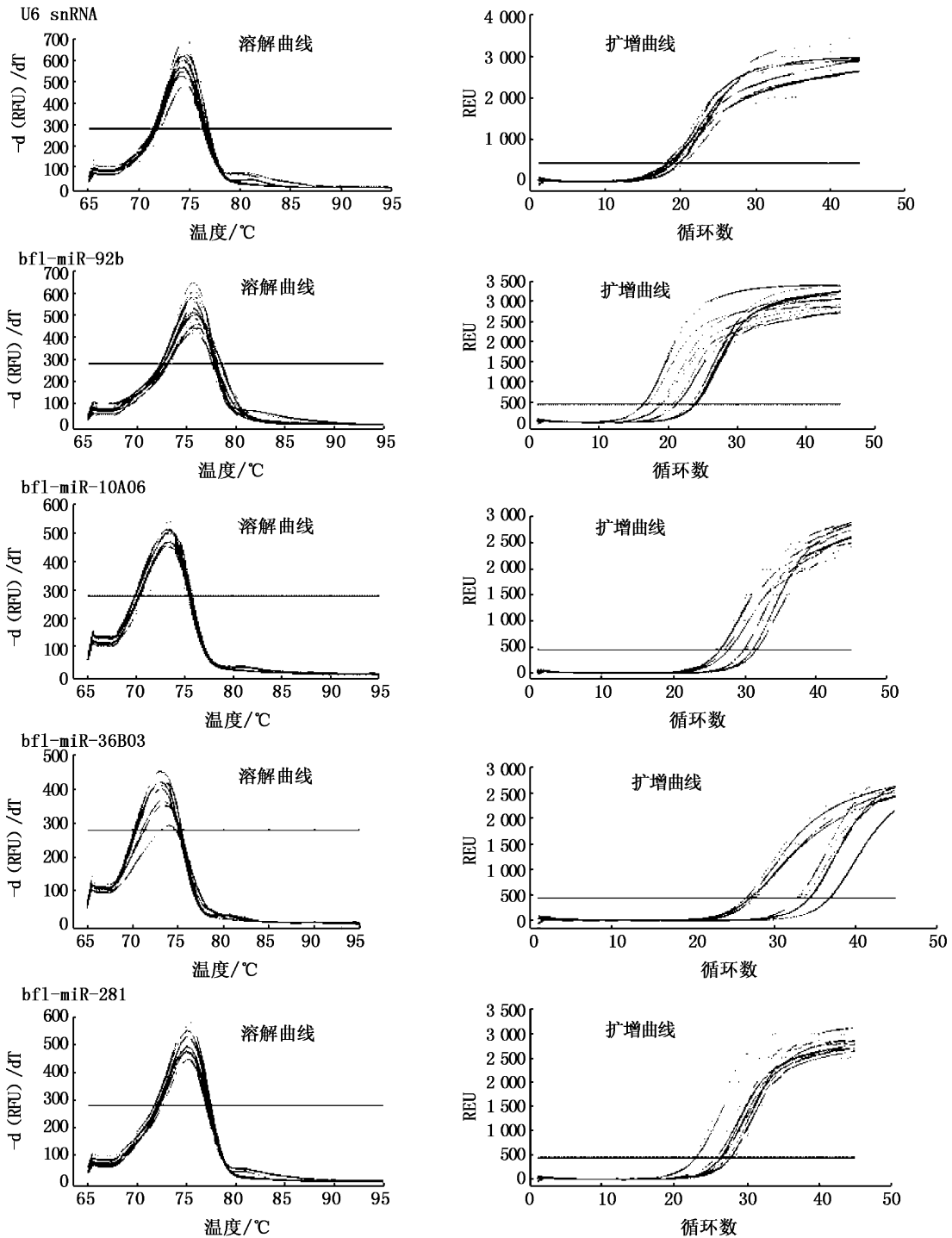


图 5 bfl-miR-92b、bfl-miR-10A06、bfl-miR-36b03、bfl-miR-281 的溶解曲线和扩增曲线

Fig. 5 Melting curve and amplification curve of qRT-PCR

参照文献[21-22]通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算对定量PCR结果进行数据分析。4个miRNA定量RT-PCR结果分析如图6所示。

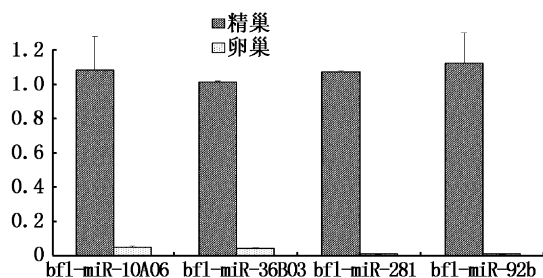


图6 定量RT-PCR结果图

Fig. 6 Real time RT-PCR analysis of miRNAs

采用荧光定量RT-PCR的方法检测了bfl-miR-92b, bfl-miR-10A06, bfl-miR-281, bfl-miR-36B03在文昌鱼精巢和卵巢中的表达。结果表明:4个miRNA在精巢中表达比卵巢高。常规RT-PCR及荧光定量RT-PCR的结果与miRNA芯片一致,表明本研究芯片结果真实可靠,且这4个文昌鱼特有的miRNA(bfl-miR-92b, bfl-miR-10A06, bfl-miR-281, bfl-miR-36B03)在日本文昌鱼的精巢中丰富表达。

3 讨论

近年来,在动植物中已证实数万种miRNA的存在,并证明了少数miRNA的功能,但大多数miRNA的功能尚不清楚。解决这一问题的关键是找出各miRNA在细胞或组织中的时空表达,进而研究其与靶基因的相互作用。

本实验芯片含有针对人、鼠及文昌鱼的探针,利用芯片杂交共筛选出36个文昌鱼性腺中高表达的miRNA,其中16个miRNA(bfl-miRNA)为文昌鱼所特有(表2)。芯片结果显示,11个miRNA在文昌鱼雌雄性腺中的表达差异显著(大于2倍的差值)(表2和图3)。6个文昌鱼特有的miRNA在雌雄性腺中呈现差异表达,其中的4个miRNA(bfl-miR-92b, bfl-miR-10A06, bfl-miR-281和bfl-miR-36B03)表现出精巢高表达,2个miRNA在卵巢中呈现高表达(表2和图3)。miRNA芯片是根据mirRNA序列反向互补来设计探针检测杂交信号的,而该序列在人、鼠基因组中有多个拷贝,芯片检测结果则是这几个拷贝共同与探针杂交所得到的信号。可见,miRNA的实

际表达量通常比芯片结果低。因此,本实验筛选出来的雌雄差异miRNA要经实时荧光定量PCR实验进一步验证,以确定该miRNA在体内的真实表达。

从芯片中筛选出的4个文昌鱼特有的雄性高表达miRNA(bfl-miR-92b, bfl-miR-10A06, bfl-miR-281和bfl-miR-36B03)得到了RT-qPCR实验的证实,确实是雄性表达高于雌性。所以,本实验筛选出的文昌鱼精巢高表达的bfl-miR-92b, bfl-miR-10A06, bfl-miR-281和bfl-miR-36B03是真实可信的。本文芯片检测的结果中,hsa-miR-29b在文昌鱼精巢中表达明显高于卵巢(表2),这一结果与小鼠的mirRNA芯片杂交结果相反^[23-24]。这一差异可能是miRNA在头索类动物到脊椎类动物上的一次进化波动,其真实原因有待进一步探讨。在实时荧光定量RT-PCR实验中,本想按性腺的发育程度不同,在不同的时间点上该mirRNA的时序表达是否存在差异,但实验结果不够理想(未列出),只列出精巢和卵巢之间相比较的实验数据。所以,本实验有必要从时空水平上进一步分析miRNA的表达差异,从而获得这些miRNA在文昌鱼性腺发育过程的差异性,为更进一步研究该miRNA的功能打下基础。

总结来看,本研究根据芯片表达谱筛选了11个雌雄性腺差异表达miRNA,6个文昌鱼特有的miRNA在雌雄性腺中呈现差异表达,其中4个和2个miRNA分别在精巢、卵巢中呈现高表达。通过实时荧光定量PCR技术,证实了4个文昌鱼特有的miRNA(bfl-miR-92b, bfl-miR-10A06, bfl-miR-281和bfl-miR-36B03)表现出精巢高表达。这些雄性高表达的miRNA是否真实参与了性腺的发育调控、性别的决定等功能,还需要进一步通过靶基因预测以及功能研究来验证。

参考文献:

- [1] KIM V N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing [J]. Nature reviews Molecular cell biology, 2005, 6 (5): 376-385.
- [2] CHEN X. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development [J]. Science, 2004, 303 (5666): 2022-2025.
- [3] XU P, VERNOOY S Y, GUO M, et al. The drosophila microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism [J]. Current Biology, 2003, 13 (9): 790-795.

- [4] JULIUS BRENECKE D R H, ALEXANDER STARK R B R, COHEN A S M. Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in drosophila [J]. *Cell*, 2003, 113:25–36.
- [5] GREGORY R I, CHENDRIMADA T P, COOCH N, et al. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing [J]. *Cell*, 2005, 123(4): 631–640.
- [6] LANDGRAF P, RUSU M, SHERIDAN R, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing [J]. *Cell*, 2007, 129(7): 1401–1414.
- [7] YU Z, RAABE T, HECHT N B. MicroRNA Mim122a reduces expression of the posttranscriptionally regulated germ cell transition protein 2 (Tnp2) messenger RNA (mRNA) by mRNA cleavage [J]. *Biology of reproduction*, 2005, 73(3): 427–433.
- [8] NOVOTNY GW S S, NIELSEN J E, JONSTRUP S P, et al. Translational repression of E2F1 mRNA in carcinoma in situ and normal testis correlates with expression of the miR-17-92 cluster [J]. *Cell Death Differ*, 2007, 14(4): 879–882.
- [9] 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.
- [10] TANG F, KANEDA M, O' CARROLL D, et al. Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development [J]. *Genes & development*, 2007, 21(6): 644–648.
- [11] GIRALDEZ A J, MISHIMA Y, RIHEL J, et al. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs [J]. *Science*, 2006, 312(5770): 75–79.
- [12] PARK J K, LIU X, STRAUSS T J, et al. The miRNA pathway intrinsically controls self-renewal of Drosophila germline stem cells [J]. *Current Biology*, 2007, 17(6): 533–538.
- [13] VOORHOEVE P M, LE SAGE C, SCHRIER M, et al. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors [J]. *Cell*, 2006, 124(6): 1169–1181.
- [14] GILLIS A J, STOOP H J, HERSMUS R, et al. High-throughput microRNAome analysis in human germ cell tumours [J]. *The Journal of Pathology*, 2007, 213(3): 319–328.
- [15] HOLLAND L Z, LAUDET V, SCHUBERT M. The chordate amphioxus; an emerging model organism for developmental biology [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2004, 61(18): 2290–2308.
- [16] GARCIA-FERNÁNDEZ J. Amphioxus a peaceful anchovy fillet to illuminate Chordate Evolution (II) [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2006, 2(3): 93–94.
- [17] GARCIA-FERN N J. Amphioxus a peaceful anchovy fillet to illuminate Chordate Evolution (I) [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2006, 2(2): 30–31.
- [18] ZHANG Q J, FANG S H, WANG Y Q. Branchiostoma japonicum and *B. belcheri* are Distinct Lancelets (Cephalochordata) in Xiamen Waters in China [J]. *Zoological Science*, 2006, 23(6): 573–579.
- [19] THOMSON J M, PARKER J, PEROU C M, et al. A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression [J]. *Natural Methods*, 2004, 1(1): 47–53.
- [20] 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(20): e179.
- [21] MICHEAL W P. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucleic acids research*, 2001, 29(9): e45.
- [22] ALES TICHOPAD M D, GERHARD S, MICHAEL W P. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up [J]. *Nucleic acids research*, 2003, 31(20): e122.
- [23] TAKADA S, BEREZIKOV E, CHOI Y L, et al. Potential role of miR-29b in modulation of Dnmt3a and Dnmt3b expression in primordial germ cells of female mouse embryos [J]. *RNA*, 2009, 15(8): 1507–1514.
- [24] YAN N, LU Y, SUN H, et al. A microarray for microRNA profiling in mouse testis tissues [J]. *Reproduction*, 2007, 134(1): 73–79.

Screening and identification of highly expressed miRNAs in amphioxus *Branchiostoma japonicum* testis tissues

JIANG Shou-wen¹, DAI Zhong-hua², CHEN Liang-biao², XU Qiang-hua^{1,3,4,5}

(1. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 3. Key Laboratory of Sustainable Exploitation of Oceanic Fisheries Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 4. Scientific Observing and Experimental Station of Oceanic Fishery Resources, Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China; 5. National Distant-water Fisheries Engineering Research Center, Shanghai 201306, China)

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) are endogenous-22 nucleotide small non-coding RNAs in eukaryotes genomes, which play a very important role in gene expression regulation. Sexual dimorphism miRNA screening would help in understanding gonad development mechanism. In this study, we firstly isolated small RNAs from amphioxus *Branchiostoma japonicum* gonad. By microarray analysis, we totally identified 36 miRNAs, which were abundantly expressed in amphioxus gonad. Among them, 11 miRNAs were regarded as sexual dimorphism miRNAs in amphioxus. Six miRNAs (bfl-miR-92b, bfl-miR-10A06, bfl-miR-281, bfl-miR-36B03, bfl-miR-29B02 and bfl-miR-26A01) specific to amphioxus were regarded as sexual dimorphism miRNAs, among which, 4 miRNAs showed high expressions in testis whereas 2 miRNAs exhibited high expressions in ovary tissue. In addition, bfi-miR-92b, bfl-miR-10A06, bfl-miR-281 and bfl-miR-36B03 were identified as high abundantly expressed miRNA in amphioxus testis by using RT-qPCR techniques. All these results provided a basis for sexual dimorphism miRNA function identifications in the future.

Key words: amphioxus; microRNA; gonad; microarray; real time-qPCR