

曹 访,刘 莉,采克俊,等. 五月龄翘嘴红鲌性腺组织小 RNA 转录谱的分析比较[J]. 江苏农业科学,2020,48(2):77-82.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.02.013

五月龄翘嘴红鲌性腺组织小 RNA 转录谱的分析比较

曹 访¹,刘 莉²,采克俊¹,吴成龙¹,周俊波¹

(1. 湖州师范学院生命科学学院/浙江省水生生物资源养护与开发技术研究重点实验室/中国水产科学研究院水生动物繁育与营养重点实验室,浙江湖州 313000; 2. 浙江省淡水水产研究所,浙江湖州 313001)

摘要:采用转录组高通量测序方法,比较分析幼龄翘嘴红鲌精巢、卵巢组织中小 RNA 转录谱。结果显示,精巢、卵巢的小 RNA 分布的峰值分别为 28、29 nt,与一般物种的 22~24 nt 有较大的差异;在小 RNA 库中,经比对注释的比例很低,分别为 2.5%、2.1%。在比对注释的斑马鱼 miRBase、斑马鱼 ncRNA、piRNA、Rfam 数据库中,精巢组织中被 miRBase 数据库注释的比例最高,为 1.49%;而卵巢组织中被 miRBase 和 piRNA 数据库注释的比例接近,分别为 0.94% 和 0.96%。比较表达量相对较高的共有 miRNA 分子,均是与胚胎发育相关的分子,且大多是精巢组织的表达量高于卵巢组织,这些 miRNA 分子在个体发育中可能具有重要意义。初步获得了翘嘴红鲌不同性腺组织的转录谱,为今后进一步分析小 RNA 在生殖发育中的调控作用奠定了基础。

关键词:翘嘴红鲌;精巢;卵巢;miRNA;转录谱;分析;比较

中图分类号:S917.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)02-0077-06

生物体内的小分子非编码 RNA 通过转录和转录后调节形成遗传信息的表达调控网络,在细胞的分裂分化、个体生长发育和繁殖等生命活动过程中具有重要的作用。已发现的这类小 RNA 包括 siRNA (small interfering RNA)、miRNA (microRNA)、hsRNA (heterochromatin associated small RNA) 和 piRNA (piwi interacting RNA) 等。发掘新的小分子非编码 RNA、研究其生物学功能及作用机制在生命科学研究中具有重要意义,目前研究较多的是

miRNA。鱼类的 miRNA 也已在斑马鱼、红鳍东方鲀等几个模式种以及非模式鱼类的虹鳟鱼中被发现报道^[1-2]。

miRNAs 是一类非编码、长度约 22 nt 的小 RNA 分子,由 60~80 nt 的茎环前体分子衍生而来,广泛存在于动物、植物甚至病毒中。miRNAs 通过调节靶标 mRNAs 的稳定性和翻译效率,在基因的表达中起着非常重要的作用,影响着各个生理过程,包括代谢、细胞凋亡、神经系统发育、免疫防御、肿瘤病理过程等。自从 1993 年首次在秀丽线虫中发现 miRNA (lin-4) 以来^[3],有大量关于 miRNAs 的生物合成、功能和作用机制的研究^[4-6]。尽管 miRNAs 的作用早已发现,但有关 miRNA 转录组的研究最近几年才开始。过去主要是通过直接克隆、测序、northern blot 杂交分析等鉴定逐个对 miRNAs 鉴定。

收稿日期:2018-10-17

基金项目:浙江省淡水养殖科技创新团队项目(编号:2012R10026_05);浙江省钱江人才计划(编号:2012R10076)。

作者简介:曹 访(1980—),男,江苏丰县人,硕士,高级实验师,研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail:hzyzuef@hotmail.com。

[12] 宣继萍,章 镇,房经贵,等. 苹果品种 ISSR 指纹图谱构建[J]. 果树学报,2002,19(6):421-423.

[13] Zhao W G, Miao X X, Zang B, et al. Construction of fingerprinting and genetic diversity of mulberry cultivars in China by ISSR markers [J]. Acta Genetica Sinica, 2006, 33(9): 851-860.

[14] 葛亚英,张 飞,沈晓岚,等. 丽穗凤梨 ISSR 遗传多样性分析与指纹图谱构建[J]. 中国农业科学,2012,45(4):726-733.

[15] 樊 杰,张 奇,吴 田,等. 云产品牌卷烟主体烟叶原料的复烤烟指纹图谱的构建[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2015, 41(6): 627-630.

[16] 刘 君,赵 琴,杨志民. ISSR 分子标记对 9 种狗牙根的鉴定

分析[J]. 草业学报,2012,21(6):159-165.

[17] 胡雪华,何亚丽,安 渊,等. 上海结缕草 JD-1 和结缕草属几个主要坪用草种的 ISSR 指纹分析[J]. 上海交通大学学报(农业科学版),2005,23(2):163-167.

[18] 李春杰,南志标. 混播对草坪建植与病害的影响[J]. 草业科学,2002,19(8):63-66.

[19] 刘 伟,张新全,李 芳,等. 西南区野生狗牙根遗传多样性的 ISSR 标记与地理来源分析[J]. 草业学报,2007,16(3):55-61.

[20] 贺佳圆,周建军,辛志图,等. 草地早熟禾与高羊茅不同混播比例对草坪质量的影响[J]. 草原与草坪,2016,36(2):92-96.

但这一方法对于含量较低的、表达水平变化幅度大的、瞬时表达的、与不同发育阶段相关的 miRNAs 的分析具有很大的局限性。这也解释了小规模测序主要揭示保守 miRNAs 分子,而对于低水平的非保守 miRNAs 却难以分析,高通量测序方法使非保守的、弱表达的、种特异性的 miRNAs 的分析成为可能。piRNAs 是近年来新发现的一类非编码小 RNA,具有组织特异性,调控着生殖细胞和干细胞的生长发育,对物种的遗传和维持至关重要,已在人、果蝇、斑马鱼等动物的生殖细胞中发现了这类小分子^[7-9]。

现有的鱼类生殖发育研究主要集中在斑马鱼、青鳞鱼等模式物种上,而养殖鱼类相关研究甚少,其原因与相关遗传背景是否清楚有关。但鱼类属低等脊椎动物,物种差异大,其生殖发育复杂多样,对模式生物的研究成果难以套用到养殖品种中。我国作为水产大国,很多研究者已经认识到这一点。翘嘴红鲌(*Erythroculter ilishaeformis*)是一种鲤科淡水鱼类,分布较为广泛,俗称白鱼,长江下游俗称“太湖白鱼”,是“太湖三白”之一。其肉质细嫩、营养丰富,是鱼中上品,市场价格较高。天然水域的生产量已很低,野生资源日益减少。目前已建立了翘嘴红鲌的人工繁殖技术和大规模的人工养殖技术。笔者前期的初步研究发现,雌性翘嘴红鲌的卵巢发育较雄性精巢发育早,其生长也较早。针对这一名优特色鱼种开展生殖细胞的基础生物学研究,对于品种进一步的开发利用及保护天然翘嘴红鲌的野生资源等都有重要的意义。本研究选取幼龄翘嘴红鲌的性腺开展了小 RNA 转录组的分析比较,为今后进一步开展生殖细胞发育及性别调控研究等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 组织收集与总 RNA 制备

分别取 5 月龄的 3 尾雌性及 3 尾雄性翘嘴红鲌的性腺组织各 1 g,迅速在液氮中速冻。研磨后,分别将 3 尾雌鱼和 3 尾雄鱼的组织样品混合,用 TRIzol reagent(Life Technologies 公司)试剂提取总 RNA。提取的 RNA 经紫外分光光度计、1% 琼脂糖电泳和 Agilent BioAnalyzer 2100 进行质检(安捷伦科技有限公司)。

1.2 小 RNA 文库的建立

采用 miRNA 提取试剂盒 mirVana™ miRNA

isolation kit(Ca#. AM1560 Austin TX, Thermo Fisher, US)从上述提取的总 RNA 中富集小 RNA。之后,先在小 RNA 的 5' 和 3' 末端添加 1 对接头序列,再用于接头互补的序列作为引物进行 RT-PCR。扩增的 cDNA 经 6% PAGE 胶纯化后,使用 Qubit® 2.0 Fluorometer 检测浓度,Agilent2100 检测文库的大小。由测序仪 Illumina Genome Analyzer GA-III (Illumina 公司)进行高通量测序。测序质量要求每向碱基质量大于 20(Q20)的比例不小于 85%。

1.3 生物信息学分析

原始的测序数据以去除低质量读长以及将含接头序列且大于 18 nt 序列为可用的读长作为数据过滤的依据,所用软件为 CLC genomic workbench(商业软件版本号 5.5)。经过滤的 small RNA 序列与公共数据库比对去除 rRNA、tRNA、small nuclear RNA(snRNA) and small nucleolar RNA(snoRNA),余下的序列再与 miRBase、ncRNA、piRNA、Rfam 等数据库进行比对分析。此外,应用 sRNA Toolkit 软件包里的 miRCat 工具来预测 novel miRNA;应用 miRanda 软件对 miRNA 序列以及所测序物种的 cDNA 序列进行可能的靶位点预测;用 DEGseq R 语言包结合 perl 脚本将样品的表达量进行比较分析。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 制备与小 RNA 文库的质量评价

提取精巢和卵巢混合样品的总 RNA 的 $D_{260\text{nm}}/D_{280\text{nm}}$ 分别为 2.05 和 2.02,表明其纯度较好。但同样组织量精巢样品提取的总 RNA 量明显低于卵巢的总 RNA 提取量,且 5S 的量较高。推测这可能与雌鱼较雄鱼发育快有关。此外,Agilent BioAnalyzer 2100 质检结果中 RIN 值大于 8,也表明提取质量合格。

构建的小 RNA 文库经 Qubit® 2.0 Fluorometer 检测,精巢、卵巢的小 RNA 的 cDNA 文库浓度分别为 32.6、10.6 ng/ μL ,主峰长度分别为 148、149 bp(图 1)。单端测序,读长 50 nt,测序所用 Flow cell 为 Illumina Single Read Flow cell V4,测序结果显示精巢和卵巢的 Q20 值的百分比分别为 97.4% 和 97.6%,表明测序数据可用于后续的数据分析。

2.2 数据预处理与长度分布统计

本研究采用 Illumina/Solexa 深度测序技术对幼龄翘嘴红鲌的精巢和卵巢的小 RNA 库进行了测定。应用 CLC genomics_workbench 5.5 软件对测定的数

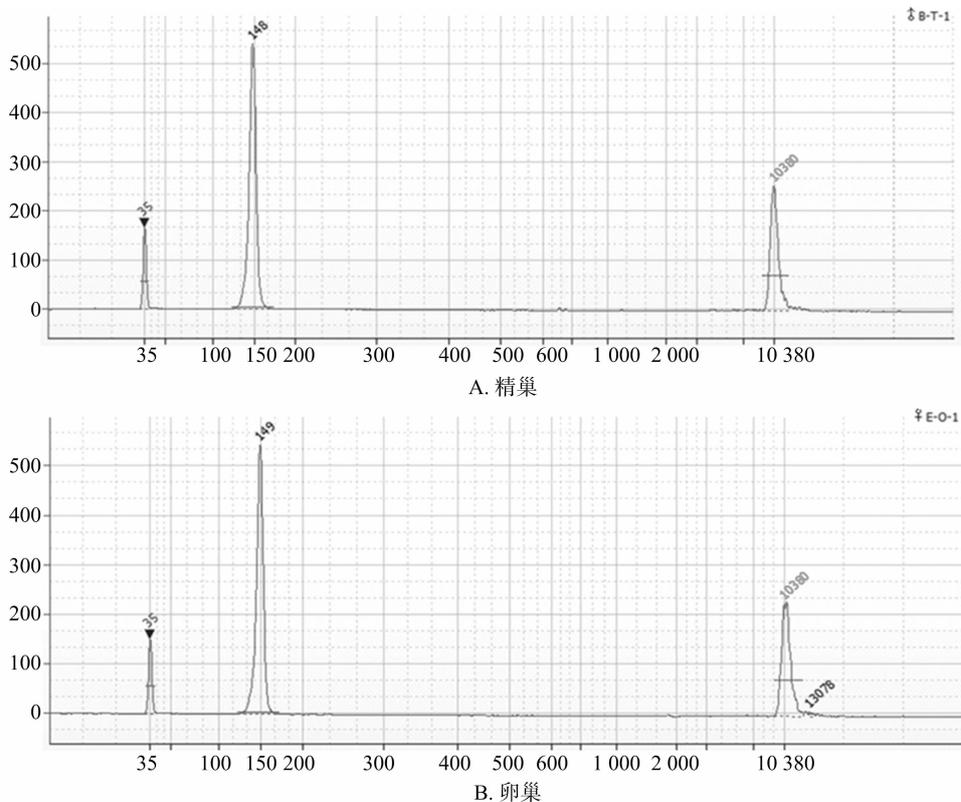


图1 Agilent BioAnalyzer 2100, 质检文库质量

据进行预处理,主要是弃去仅含接头序列、低质量序列、长度小于 15 nt 和大于 33 nt 的序列等。此外,还须排除已知的 mRNA, rRNA, tRNA, snRNA, snoRNA 和重复序列元件。测定的精巢小 RNA 原始读长(reads)为 24 752 792 个,可用于后续分析的高

质量有效读长 20 167 240 个,占 81.47%;卵巢小 RNA 的原始读长为 22 947 949 个,其中有效读长为 18 198 879 个,占 79.31%。精巢小 RNA 的序列大小分布的峰值在 28 nt,卵巢小 RNA 的峰值在 29 nt (图 2)。

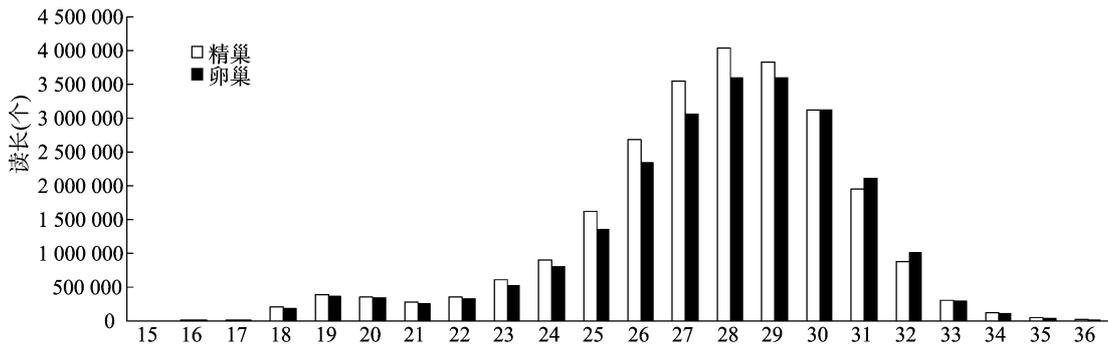


图2 小 RNA 序列长度分布

2.3 比对注释,鉴定已知 miRNA

上述处理后的序列与最新 Sanger miRBase 数据库比对,比对过程不允许有错配。另外还与其他非编码数据库 ncRNA、piRNA、Rfam 数据库比对,允许与目标序列有 2 个碱基错配、允许比目标序列两端各缩短或延长 2 个碱基。比对结果(图 3)表明,精巢的有效读长序列中,被注释的读长有 502 823 个,

占 2.5%,其中与斑马鱼 miRBase、斑马鱼 ncRNA、piRNA、Rfam 数据库比对注释的读长所占比例分别为 1.49%、0.87%、0.09%、0.05%;而卵巢组织中被注释的读长有 374 895 个,占 2.1%,被上述数据库注释的比例分别为 0.94%、0.10%、0.96%、0.07%。

用 DEGseq R 语言包结合 perl 脚本将精巢和卵

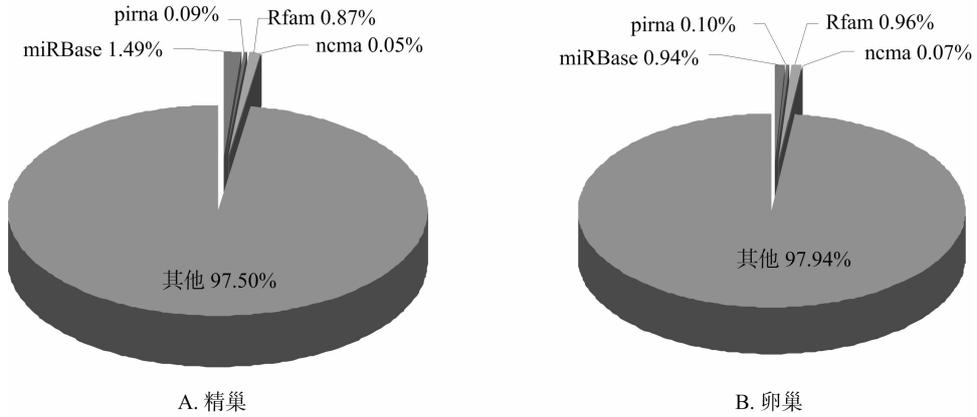


图3 与数据库比对注释的概况

巢样品的表达量进行鉴定和比较分析。2 个样品的小 RNA 中,有 219 个 miRNA 与斑马鱼 miRBase 已知 miRNA 相同,但其表达量有差异。其中有 9 个 miRNA 在精巢组织中可找到,在卵巢中没有找到;

有 4 个在卵巢中有而在精巢中没有,但这 13 个 miRNA 的表达丰度都极低。在已知 miRNA 中,较高表达丰度的 miRNA 分子在精巢中的表达绝大部分都高于卵巢(图 4)。

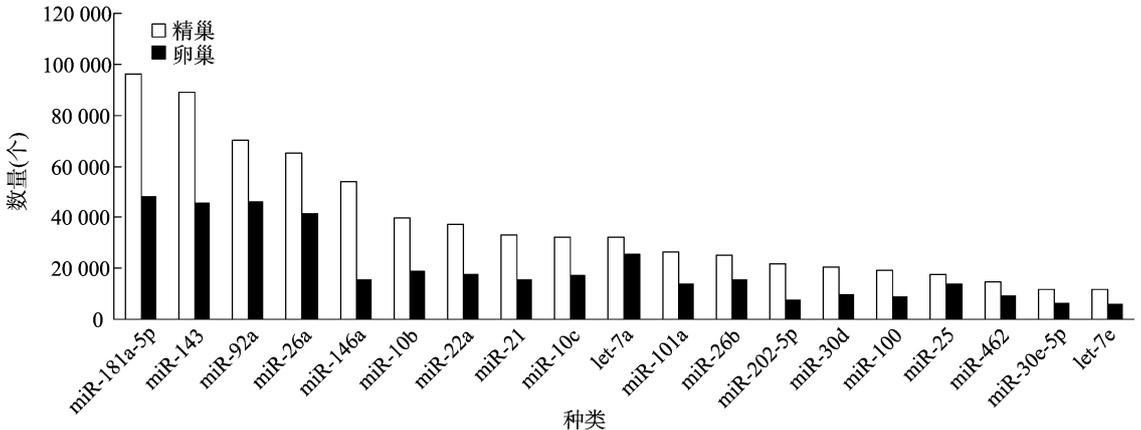


图4 部分较高丰度已知 miRNA 在翘嘴红鲌精巢和卵巢中的表达差异

2.4 新 microRNA 分子的预测

应用 sRNA Toolkit 软件包中的 miRCat 工具来预测 novel miRNA。microRNA 前体的标志性发卡结构能够用来预测新的 microRNA。将没有注释的读长(样品名_unannotated. csv) 比对到斑马鱼基因组后,通过折叠模型分析,若有序列位于茎环结构上,则初步判定该序列为 1 个候选的新 microRNA。按上述方法在精巢组织中预测到 76 个新 microRNA,卵巢组织中预测到 77 个,其中 50 个相同。预测新 microRNA 序列,见表 1。在这些预测的新 microRNA 分子中,仅在精巢和卵巢共有序列中有 4 个序列具有对应的 miRNA * 序列,分别是第 1、第 2、第 30 号序列,它们对应的 miRNA * 序列分别为:AUGAAGG UCAAUGGUUA_vC_gAGU(dre - miR - 7146 - 3p)、GAUCAUUUUUGUGAUUAUGCAGCU(dre - miR -

153c - 3p)、UCACAGUGAACCGGUCUCUUUU(dre - miR - 128 - 3p)。

3 讨论

鱼类养殖中所涉及的苗种繁育、性别控制等问题与鱼类生殖细胞的发育分化密切相关。此外,鱼类属低等脊椎动物,其生殖发育较高等脊椎动物具有更丰富的多样性。结合现代生命科学技术,弄清楚水产养殖鱼类的基础生物学问题,是进行现代育种、建设现代渔业的重要环节。本研究就具有地方特色的名优水产养殖品种翘嘴红鲌的性腺小 RNA 转录谱进行了初步的分析。笔者在研究中发现,尽管笔者所用材料均为 5 月龄翘嘴红鲌性腺,但通过组织切片观察其性腺发育阶段明显不同。该阶段精巢组织中还未见游离精子,而卵巢组织中已见游

表 1 与斑马鱼基因组比对并预测的新 miRNA 分子

序号	精巢与卵巢组织共有序列	精巢组织特有序列	卵巢组织特有序列
1	UAUGAAAGUCA AUGGUACCGU	UGUUCUGUUAUUGGACUUCUGUC	UGAUAUUCCAGUACACACAGGACA
2	UGAUGGUUUUGUGACUGCACU	UUGGUAACGACGGAACUUGCGACC	UUUUGUUUAGUGCUGGCUUCUGGG
3	UGGAUCUGGAGCGGCCUGAGGCU	CUGAAUGUGAGCCUGAAGUGGCC	UUUGAAUGUGGCUACUGUUGGACC
4	UUACAAUUAAGGAUUAUUUUU	UGAGAUUUUGGUUCCAACCACCG	UUGGAUGUUAGAGGGCACAGAGA
5	UCCAUCGGGAAGGGCUCAUCCC	UUGAUGACUGCAUCUUCGCCU	UCUUGAGCUAAUCUGAAGGCC
6	UCCAUCGGGAAGAGCUCAUCCCUA	UGAUUUCCAUAUAUUGAGACAGU	UGUGUACAGAUCCUUGCAACAUG
7	UAAAAUAGAAUUGGGAUUGGGCCU	UUGACUUGGACUCGACAAAGGUGG	UCGGGGGAGAAGAGCCUUGGUGAG
8	UGAUAAACAGCCAUCUGAGCCUACC	UCAGACUGCACGAUUUUAGCCCC	UGAUGUUGAGCUCACUGUCUGAGA
9	UUCUGGAACUCCUGCAGAUUCUGG	UUCUUAUGAGCCGGGCUUGUCC	UCUUGAAGGAAGUGUCUGUAGCCU
10	CAGACACUGAAACCGAGAUUUGAG	CCACCUAGUAGCCACAUCUGGAC	UCAUCCACAGACCUGUUUGCUC
11	UCAGUCAGAACACUUUUCACACAG	UGGGCAAAUCUCAUGAACC	UGGACUGGAGUGACAGACCGAGGA
12	UUCCAAAAAAGUUGGGACACUGUA	UCAGACAGUAGAAGAGAUUGAUGG	UGCUUCAGGACCUGGAAGACU
13	UAUCUCAGAAUUCUGACUUUAUUAU	UAGAGUUUCUCAGUGAAAGACUGA	UGAUGAUUGACAGGACUGAAUG
14	AAACUCAUGAAACUUUGCACACG	UAGUUUGAUUCACAGCACAAAG	UCCAUCGUAGGUGAUUUUCUCUGCG
15	UGC UUAGUUGAGCUCUUGACCC	UUCUGAAUGAUC AUGUGACACU	UACUGAAGGAUUCACACUGUAAAC
16	UUCACGCCGGUAUCUGGGCCACACA	UAUUGGUGGAUCUCAUGUGAGUGA	UCUGUAUUCACUCUGGUGAAGUCU
17	UAGACUGAGAGACCAUUUAAAGGC	ACAUAAGACAUGACAGUCCUGGGC	UAGUUGGAACACACCCUCCGGUCC
18	UUGGACUAGAAAACAAGACAAAUCU	UGAAGAUGCUGGAUGUGGAGGUCC	UGAUGUUGUAAUUGAUGCAGUAUG
19	UCUCCCGGACACGGAUUGCCUCCC	UCCAUGGUUCAGUCUUGCUGUAAG	UCGGAUAUAGCGGCUUUUGCU
20	UAAACUCUGCAGGACAGUGGCC	UUCUGGAGGAUCAUGUGACACU	UGUGAUCCUCCUGACAUAAUGGC
21	UAUGAUUGUAAAGCACUUUGGGUG	CACACACACAGCAGGUAGG	UCUGAUGGUGUCCUCUCUUGCACC
22	UUUGAAACUAGGCUCUGGCUCUGA	UUCUGAGAUACUGAAUUUGGG	UCCAAAGUUCUUCGUUUGACU
23	UCCGUAGGACGUUAACACACUG	UGUUGAUUUGUCUGAAUUGCCAGA	UACUACUCCGGCGAGAAUCUGAA
24	UCCAUCAGUCACGUGACCUACC	AUCCAGUAUGGUUUCCGGCCUUG	UUUGUCAUUGUGUGAGCCACACU
25	UCCGAUCGAGUCUGAAACCACGU	UUGGAUCUGAUAAAUGCACGCGUC	UCCCAUGAACCCUCUAGCACCCU
26	UACUGAACUAGAGAGCUGAUUGA	AUGAACCGAACCCGGGUUAAGGC	UUGAUUCUGAUUGGUCAAUAGCU
27	UUCUUACCUUGGCCAUGUCUCUGA	UUCUGAGAUUAAAAGUCGCAAU	
28	UGGUGUCUGGACUACUGAGGCC		
29	UUGUUUUUCAGGGUUGGGCUUG		
30	UGUGAGCCGGUUUCUUUGUAGCGC		
31	UGACUGAGAAUGAUGCCUUGACA		
32	GCGGGCACUCUGGACGUGCGCC		
33	UGGAGAAGUUUUGACAUGCCCU		
34	UACUGGAAUUUGUCUCUGC		
35	UUAUACGCAUGGGACUCAGUGUG		
36	UUAGAUCGUAAAAUAGGGCCC		
37	UAUCUGUAGAGCUGCGGGCUGGGC		
38	UCGAGUCUGAAACCAGGUAUCGG		
39	UACUAUGAAUUCGGACAUAUCUACU		
40	UAAACGCGUCCAGUCAGACUC		
41	UGAGAUGAUUUGAGCUUUGUGACA		
42	UACAAUCCUGUCUGGAGGU		
43	UGUGCACUUAGACCUGCAUGGCU		
44	UACCUGAGCUCAGGGUAUCGGCC		
45	UUCAAGUCUGGGCUCUGGCU		
46	UAAGACUGAAAGGUGGACAUGAGG		
47	AGAGAGACUGUCGUUUGGGG		
48	UAUUCAUGGCUGUGUUUUUGGGCA		
49	UAAUAAACCAGAACUGACCCU		
50	UACCUGGACUGAGUUUUCUGCA		

离的卵子;提取总 RNA 时也发现,卵巢组织总 RNA 中 5S RNA 的含量很高。目前,已有翘嘴红鲌全雌育种技术的应用,主要是利用雌性生长较雄性快的特点,从其性腺的发育来看,也是雌性发育较雄性早。

从获得的小 RNA 数据与现有数据库比对结果来看,可注释的序列比例非常低,97% 以上的序列无法注释,这一方面反映了鱼类基因组信息的多样性,另一方面也提示模式生物的遗传信息对于鱼类基因组、转录组等研究具有较大的局限性。在小 RNA 序列分布中,发现其峰值在 28 ~ 29 nt,这一值较其他物种明显偏高。已报道的其他物种小 RNA 大小分布的峰值一般在 22 ~ 24 nt,也有报道在 26 nt^[10]。仔细校验测序过程,证实其样品制备及测序质控均符合要求,说明该结果与物种有关。但是否因其特殊的发育阶段导致,还须与其他发育阶段的小 RNA 转录组比较。

在被注释的已知 miRNA 中,miR - 181a - 5p、mir - 143 - 1、mir - 92a - 1、mir - 26a - 1、miR - 146a、mir - 10b - 1、mir - 22a、mir - 21 - 1、mir - 10c、let - 7a - 1 等这些表达量较高的 miRNA 分子,均与斑马鱼的个体发育密切相关^[11-12]。此外,在小 RNA 转录谱已比对注释的分子中,精巢 miRNAs 所占比例最高,为 1.49%,而卵巢中已注释的 miRNAs 和 piRNAs 所占比例接近,分别为 0.94% 和 0.96%,这可能也与同一年龄的精巢和卵巢组织实际上是处于不同的发育阶段有关,其中 miRNAs 和 piRNAs 的消长规律值得进一步探讨。

4 结论

本研究采用转录组高通量测序方法,比较分析了幼龄翘嘴红鲌精巢和卵巢组织中小 RNA 转录谱,由于没有翘嘴红鲌基因组信息,新 miRNA 的预测只能以斑马鱼基因组信息为基础展开。结果显示,部分预测的同一个新 miRNA 分子位于不同的染色体

上,由此推测这些成熟的 miRNA 分子在翘嘴红鲌的基因组中也可能对不同的基因起到调控作用。下一步,笔者可继续比较分析其他不同发育阶段性腺小 RNA 转录谱,可能找出性别调控的关键 miRNAs 或 piRNAs。

参考文献:

- [1] Cheng J, Kricka L J. Biochip technology [M]. Pennsylvania: Harwood Academic Publishers, 2001.
- [2] Boeddrich A, Burgtorf C, Roest C H, et al. Analysis of the spermine synthase gene region in *Fugu rubripes*, *Tetraodon fluviatilis*, and *Danio rerio* [J]. Genomics, 1999, 57(1): 164 - 168.
- [3] Lee F 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: 843 - 854.
- [4] Lu J, Getz G, Miska E A, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers [J]. Nature, 2005, 435(743): 834 - 838.
- [5] 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.
- [6] Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, et al. Requirement of Bic/microRNA - 155 for normal immune function [J]. Science, 2007, 316(5824): 608 - 611.
- [7] John B, Enright A J, Aravin A, et al. Human microRNA targets [J]. PLoS Biology, 2004, 2(11): e363.
- [8] Aravin A A, Lagos - Quintana M, Yalcin A, et al. The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development [J]. Developmental Cell, 2003, 5(2): 337 - 350.
- [9] Thatcher E J, Bond J, Paydar I, et al. BMC genomics [Z]. 2008: 253.
- [10] Kim V N, Han J J, Siomi M C. Biogenesis of small RNAs in animals [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2009, 10(2): 126 - 139.
- [11] Mishima Y. Widespread roles of microRNAs during zebrafish development and beyond [J]. Development Growth & Differentiation, 2012, 54(1): 55 - 65.
- [12] Wei C Y, Salichos L, Wittgrove C M, et al. Transcriptome - wide analysis of small RNA expression in early zebrafish development [J]. RNA, 2012, 18(5): 915 - 929.