

УДК 577.212.3

ОБНАРУЖЕНИЕ микроРНК У *Batrachuperus yenyuanensis* С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ГЛУБОКОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ И ПРЕДСКАЗАНИЕ ИХ ВЕРОЯТНЫХ ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ^{*,**}

© 2019 Y. Huang^{1***}, J. Xiong^{1***}, P.B. Brown², X. Sun¹

¹ College of Animal Science and Technology, Henan University
of Science and Technology, Luoyang, 471023, China;
E-mail: huangyong1979111@126.com; xjlpanda@126.com

² Department of Forestry and Natural Resources, Purdue University,
West Lafayette, 47907, Indiana, USA

Поступила в редакцию 14.07.2018

После доработки 29.10.2018

Принята к публикации 29.10.2018

МикроРНК (miRNAs) образуют семейство одноцепочечных некодирующих молекул РНК, образованных ~22 нуклеотидами каждая, которые рассматриваются как ключевые пост-транскрипционные регуляторы экспрессии генов, оказывающих большое влияние на различные биологические процессы в живых организмах. У животных были выявлены многочисленные микроРНК, однако лишь малое их количество было идентифицировано у видов углозубых (Hynobiidae). Поэтому целью настоящей работы была идентификация полного набора микроРНК у *Batrachuperus yenyuanensis* (Длиннохвостый углозуб), которая может способствовать значительному повышению уровня наших знаний о микроРНК земноводных. Была создана библиотека малых РНК из *B. yenyuanensis*, которая затем была подвергнута анализу с помощью метода глубокого секвенирования. В результате проведенного секвенирования, были получены 1 717 751 чистых ридов (прочтений), которые соответствовали 356-ти уже известных микроРНК и 80-ти новым. Кроме того, были подтверждены уровни экспрессии восьми отобранных случайным образом микроРНК *B. yenyuanensis* с помощью метода количественной ОТ-ПЦР «стебель–петля». Также, были предсказаны 13 972 возможные мишени для этих идентифицированных микроРНК, хотя физиологические функции для многих мишеней этих микроРНК остаются до сих пор не выясненными. Затем проведенный анализ онтологии генов (GO – Gene Ontology) и обогащения путей KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) позволили предположить, что эти предсказанные мишени вовлечены в большое многообразие физиологических функций у *B. yenyuanensis*. Полученные результаты предоставили полезную информацию для проведения дальнейших исследований микроРНК, которые вовлечены в процессы роста и развития представителей вида *B. Yenyuanensis* и способствуют их адаптации в сложной для проживания высокогорной местности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Batrachuperus yenyuanensis*, микроРНК, глубокое секвенирование, семенник, количественная ОТ-ПЦР «стебель–петля» (stem-loop qRT-PCR).

DOI: 10.1134/S0320972519040055

МикроРНК (miRNAs – microRNAs) – это короткие эндогенные некодирующие РНК длиной ~22 нуклеотида (н.), которые действуют как пост-транскрипционные, негативные регуляторы стабильности мРНК или вызывают подавление трансляции мРНК путем связывания с 3' не-транслируемым участком (UTR) мРНК-мишени или с 5' UTR [1, 2]. Зрелые микроРНК в боль-

шинстве случаев транскрибируются с некодирующих участков генома. Исходно они транскрибируются с помощью РНК-полимеразы II в виде длинного первичного транскрипта, который далее подвергается процессингу с помощью белков Drosha и DGCR8 с образованием предшественника микроРНК (пре-микроРНК) длиной ~70 н., для которых характерна вторичная

Принятые сокращения: miRNA или miR – микроРНК, ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией, н. – нуклеотид, мяРНК (snRNA) – малые ядерные РНК, мякРНК (snoRNA) – малые ядрышковые РНК, РС – «предсказываемые кандидаты» (predicated candidate).

* Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) и на сайте издательства Springer (Link.springer.com), том 84, вып. 4, 2019.

** Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», ВМ 18-202, 24.12.2018.

*** Адресат для корреспонденции.

структура типа шпильки [3]. Затем пре-микроРНК экспортируются в цитоплазму и далее подвергаются процессингу с помощью белка Dicer (РНКаза III типа), с образованием дуплекса микроРНК/микроРНК* [4]. В завершение, одна цепь РНК-дуплекса (зрелая микроРНК) преимущественно встраивается в комплекс RISC (RNA-induced silencing complex), в котором она негативно регулирует экспрессию генов за счет ингибирования трансляции мРНК или способствуя деградации кодирующей мРНК через полную или неполную комплементарность с мРНК, служащими в качестве их мишени [5, 6]. Согласно компьютерному анализу, одна и та же микроРНК может связываться со многими мРНК-мишенями, и один ген-мишень также может регулироваться многими микроРНК [7, 8]. Все больше данных свидетельствует в пользу того, что микроРНК играют ключевую роль во многих физиологических и биохимических процессах у эукариот, включая развитие, пролиферацию, дифференциацию клеток, их метаболизм, гомеостаз, апоптоз, иммунный ответ, защиту от вирусов и стресс, вызванный окружающей средой [9–12].

Длиннохвостые углозубы (*Batrachuperus yenyuanensis*) принадлежат к хвостатым высокогорным углозубам (Amphibia, Caudata, Hynobiidae, *Batrachuperus*) и являются эндемичными животными для Китая. В основном, саламандры обитают в горах Хендуань и их окрестностях [13], преимущественно на юге провинции Сычуань, в том числе, в округах Янюань, Сичан, Мьянин и Пуксон. Они обычно живут и выводят потомство в горных реках на большой высоте, где течение медленное и в русле реки находится много камней. Взрослые особи в основном живут в воде и питаются креветками и водными насекомыми. В традиционной тибетской и китайской медицине личинки *B. yenyuanensis* используются для лечения ран, переломов, контузий, растяжений и боли в суставах. Из-за уникального медицинского значения и постоянно растущей рыночной цены люди стали усиленно истреблять этот вид, что вызвало резкое падение численности популяций и даже локальное полное исчезновение. Кроме того, в результате развития инфраструктуры выживание этого вида оказалось под угрозой из-за разрушения их мест обитания. С 2004 г. *B. yenyuanensis* включен в список особо охраняемых государством животных (категория II) в соответствии с законом об охране природы Китая и Приложением I Конвенции по международной торговле видами дикой фауны и флоры (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, CITES).

В предыдущих работах по видам из рода углозубых (Hynobiida) основное внимание уделялось их жизненным привычкам, морфологии, биоразнообразию, распределению популяции, филогеографии и их транскриптомам [14–17]. Однако до сих пор нет информации, касающейся микроРНК, экспрессируемых в *B. yenyuanensis*. В настоящей работе с помощью метода глубокого секвенирования нами впервые были охарактеризованы новые и уже известные ранее микроРНК из *B. yenyuanensis*. Для подтверждения уровня экспрессии отобранных микроРНК из *B. yenyuanensis* был использован метод количественной ПЦР в реальном времени с обратной транскриптазой (кОТ-ПЦР) и определением структуры типа «стебель–петля» (stem-loop qRT-PCR). Возможные мишени микроРНК были предсказаны с помощью методов предсказания мишеней. Идентификация микроРНК у *B. yenyuanensis* поможет обогатить репертуар микроРНК земноводных. Полученные в настоящей работе результаты также обеспечат основу для дальнейших исследований функций этих микроРНК, которые принимают участие в физиологических процессах, иммунном ответе, и адаптивной эволюции вида *B. yenyuanensis*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение образцов. Здоровые самцы *B. yenyuanensis* были получены из округа Янюань (Сычуань, Китай). В работе использовали целые туши трех представителей *B. yenyuanensis*. Ткани семеника, предназначенные для получения РНК, быстро замораживали в жидком азоте и хранили при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до дальнейшего использования.

Конструирование библиотеки РНК и глубокое секвенирование. Общую РНК экстрагировали из смеси тканей трех особей *B. yenyuanensis* с использованием реагента RNeasy («Takara», Китай) согласно инструкциям производителя. Количество и чистоту препарата общей РНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 («NanoDrop», США) по соотношению оптической плотности при 260 и 280 нм ($A_{260}/A_{280} > 2,0$). Целостность препарата общей РНК анализировали с помощью биоанализатора Agilent 2100 Bioanalyzer («Agilent Technologies», США) при значении RIN (RNA integrity value) $> 8,0$. Вкратце, фракцию малых РНК длиной 15–50 н. получали из препарата общей РНК с помощью электрофореза в 15%-ном полиакриламидном геле в Tris-боратном буфере, также содержащем ЭДТА и мочевины. Малые РНК последовательно лигировали с РНК 5' и 3' адапторами («Illumina», США).

После проведения обратной транскрипции, полученные кДНК использовали для генерации кластеров на аппарате по получению кластеров («Illumina», США) и затем подвергали секвенированию с помощью аппарата для секвенирования Illumina GAIIx («Illumina», США) в соответствии с инструкциями производителя. Затем полученные необработанные данные помещали в базу данных NCBI под номером доступа SRP153555.

Анализ данных, полученных при секвенировании, и идентификация микроРНК. Из данных, полученных в результате секвенирования, удаляли риды низкого качества. После маскировки последовательностей адаптора и вектора и удаления излишних ридов, чистые риды аннотировали на наличие малых РНК, таких как рРНК, малая цитоплазматическая РНК (scRNA), малые ядерные РНК (snRNA), малая ядрышковая РНК (snoRNA), и тРНК из баз данных GenBank и Rfam. Чтобы идентифицировать уникальные малые РНК, которые были картированы в аннотации, мы придерживались следующего правила приоритетности: рРНК и др. (в которых GenBank > Rfam) > известная микроРНК > повтор > экзон > интрон, и совпавшие тэги ncRNA были удалены из пула неаннотированных тэгов с использованием программы RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org>). Оставшиеся риды были просмотрены в базе данных miRBase 21.0 (<ftp://mirbase.org>), чтобы идентифицировать уже известные микроРНК. Для выявления новых микроРНК использовали программный пакет Mireap (<http://sourceforge.net/projects/mireap/>). Были подобраны следующие критерии для предсказания вторичной структуры: 1) число нуклеотидов в одной выпуклой части стебля (≤ 12); 2) число пар оснований в стеблевом участке предсказанной шпильки (≥ 16); 3) пороговое значение свободной энергии (≤ 15 ккал/моль); 4) длина шпильки (сверху и снизу ствол + концевая петля) ≥ 50 ; 5) длина петли шпильки (≤ 20); 6) число нуклеотидов в одной выпуклости в зрелом участке (≤ 8); 7) число необъективных ошибок в одной выпуклости в зрелом участке (≤ 4); 8) число необъективных ошибок в зрелом участке ≤ 2 ; 9) число ошибок в зрелом участке (≤ 7); 10) число пар оснований в зрелом участке предсказанной шпильки (≥ 12); 11) процент нуклеотидов в стволовом участке зрелой микроРНК ($\geq 80\%$).

Подтверждение экспрессии микроРНК с помощью количественной ПЦР с обратной транскриптазой (Stem-loop qRT-PCR). Чтобы подтвердить наличие и экспрессию идентифицированных микроРНК, случайным образом были отобраны восемь микроРНК для проведения количественной ПЦР с обратной транскриптазой (КОТ-ПЦР)

с помощью праймера обратной транскрипции. Праймеры были сконструированы с помощью методов, которые были ранее описаны [18, 19]. Условия проведения КОТ-ПЦР включали: один цикл при 95 °С в течение 15 мин, затем 40 циклов: 94 °С – 15 с, 55 °С – 30 с, 70 °С – 30 с. Было проведено три независимых эксперимента. Фолд-изменение экспрессии генов оценивали в виде пороговых циклов с помощью метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$. 16S рРНК была использована в качестве внутреннего контроля. Все праймеры, которые были использованы для валидации микроРНК, и их экспрессии приведены в табл. S1 в Приложении.

Предсказание генов-мишеней и анализ сигнальных путей. На основании последовательностей ранее уже известных и новых микроРНК, с помощью программных пакетов miRanda (v. 3.3a) и Targetscan (v. 7.0) были предсказаны кандидатные гены-мишени. Были выбраны следующие параметры: 1) точная комплементарность микроРНК (положения 2–8) с транскриптами; 2) score > 50 и значение свободной энергии менее –20 ккал/моль. Перекрывающиеся результаты предсказания с помощью обоих программных пакетов были отобраны как предсказанные гены-мишени микроРНК. Более того, биологические функции генов-мишеней были оценены с помощью анализа обогащения онтологии генов (GO), и было подсчитано количество генов в каждом термине онтологии. Для идентификации биологических путей, в которых задействованы выявленные гены-мишени, предсказанные мишени были классифицированы в функциональные пути с помощью анализа путей KEGG.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Глубокое секвенирование малых РНК. С помощью платформы для глубокого секвенирования «Illumina HiSeq 3000» всего было получено 11 514 774 исходных ридов из библиотеки малых РНК. После удаления отфильтрованных с помощью «3ADT&length» прочтений, выявления мусорных ридов, рРНК, тРНК, мяРНК, мякРНК и других РНК, находящихся в базе данных Rfam, а также последовательностей из базы данных Repbase, в конечном итоге было получено 1 717 751 уникальных ридов, представляющих 869 818 подтвержденных ридов с длиной 18–26 н. (табл. 1). Распределение подтвержденных ридов по их длине показано на рис. 1. В большинстве случаев длина этих малых РНК находилась в диапазоне 19–24 н., что является типичной длиной малых РНК у животных после их процессинга с участием белка Dicer [20, 21]. Наиболее часто встречающимся размером была длина 22 н., ко-

Таблица 1. Анализ последовательностей малых РНК у *B. yenyuanensis*

Тип	Всего ридов	%	Уникальные риды	%
Исходные риды	11 514 774	100	1 717 751	100
Фильтр 3ADT&length	5 692 352	49,44	803 273	46,76
Мусорные риды	27 110	0,24	13 408	0,78
Rfam	343 383	2,98	28 477	1,66
Повторы	69 548	0,60	4 176	0,24
Картируемые риды	5 407 005	46,96	869 818	50,64

торая была отмечена для 33,69% библиотеки. Затем следовали 21, 20 и 23 н. (21,17%, 13,17% и 11,88% соответственно). Малые РНК с длиной более 25 н. могут являться малыми интерферирующими РНК, ассоциированные с повторами (rasiRNAs; repeat-associated small interfering RNAs), которые опосредуют сайленсинг геномных повторов и транспозонов [22].

Идентификация и характеристика ранее известных микроРНК. Чтобы идентифицировать уже известные микроРНК у *B. yenyuanensis*, нами были проанализированы подтвержденные риды, и все последовательности малых РНК были подвергнуты сравнению с известными животными микроРНК в базе данных miRBase 21.0 с помощью программы BLASTN. Всего было идентифицировано 356 известных зрелых микроРНК (5р и 3р), которые входили в 98 семейств (табл. S2 в Приложении). Технология глубокого секвенирования является мощным инструментом для оценки уровня экспрессии микроРНК, который также обладает способностью генерировать миллионы ридов малых РНК. Более того, секвенирование считываний различных микроРНК, как правило, отражает их относительное обилие, и может быть использовано для оценки уровней экспрессии микроРНК [23]. Интересно, что число ридов идентифицированных известных микроРНК значительно различается. Например, десять наиболее обильно представленных микроРНК (*dre-miR-202-5p_R-1*, *aca-miR-99b-5p_R-1*, *dre-miR-122_R-1*, *hsa-miR-30c-5p_R-2*, *hsa-let-7a-5p*, *aca-miR-21-5p*, *aca-miR-451-5p_R-1*, *hhi-miR-26_R-1*, *aca-miR-126-3p_R-1* и *aca-miR-16b-5p*) имели более 8 000 ридов (табл. 2), в то время как многие микроРНК были секвенированы только один раз, как, например, *scr-miR-27c-3p_R-1*, *ipu-miR-30d_R-2_1ss9TC*, *aca-miR-202-3p.1_R+2_1ss10CT*, *ola-miR-192-3p_R-1_1ss8GA* и *hsa-miR-500a-3p_L+1R-2_1ss18AG*. Эти результаты позволяют предположить, что широко представленные микроРНК могут играть важную роль в развитии или физиологии *B. yenyuanensis*. А микроРНК, которые были относительно редко прочтены, могут функционировать на других стадиях развития или в физиологических условиях, специфичных для отдельных органов [24, 25]. Было показано, что микроРНК с высоким числом ридов играют важную регуляторную роль. Например, в предыдущих работах было подтверждено, что *miR-202-5p* повышено экспрессируется в семеннике мышей, лягушек, петухов и атлантического палтуса [26–28]. Аналогично, *dre-miR-202-5p_R-1* показывает повышенную экспрессию и 206 216 ридов у *B. yenyuanensis*. Было показано, что *miR-99b-5p* показывает аномальную экспрессию при различных злокачественных опухолях и способствует апоптозу клеток путем нацеливания на mTOR при плоскоклеточной карциноме пищевода и регулирует клеточный ответ на повреждения ДНК [29, 30]. *MiR-26a* регулирует клеточный цикл и дифференциацию клеток [31, 32], сообщалось, что *miR-21* имеет важное значение для самообновления стволовых клеток сперматогониев и сперматогенеза [33]. Кроме того, *miR-21* может

роРНК, которые были относительно редко прочтены, могут функционировать на других стадиях развития или в физиологических условиях, специфичных для отдельных органов [24, 25]. Было показано, что микроРНК с высоким числом ридов играют важную регуляторную роль. Например, в предыдущих работах было подтверждено, что *miR-202-5p* повышено экспрессируется в семеннике мышей, лягушек, петухов и атлантического палтуса [26–28]. Аналогично, *dre-miR-202-5p_R-1* показывает повышенную экспрессию и 206 216 ридов у *B. yenyuanensis*. Было показано, что *miR-99b-5p* показывает аномальную экспрессию при различных злокачественных опухолях и способствует апоптозу клеток путем нацеливания на mTOR при плоскоклеточной карциноме пищевода и регулирует клеточный ответ на повреждения ДНК [29, 30]. *MiR-26a* регулирует клеточный цикл и дифференциацию клеток [31, 32], сообщалось, что *miR-21* имеет важное значение для самообновления стволовых клеток сперматогониев и сперматогенеза [33]. Кроме того, *miR-21* может

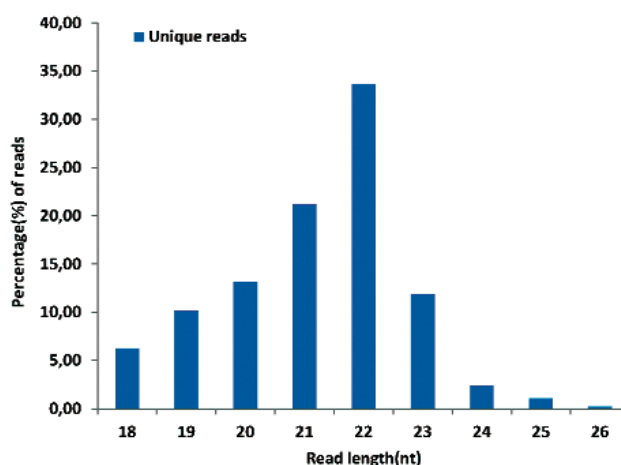


Рис. 1. Распределение величины длины секвенированных малых РНК из *B. Yenyuanensis*. С цветным вариантом рис. 1 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: www.elibrary.ru

Таблица 2. Последовательности и количество десяти наиболее известных микроРНК у *B. Yenyuanensis*

Название микроРНК	Зрелая последовательность	Число ридов
dre-miR-202-5p_R-1	TTCCSTATGCATATACCTCTTT	206 216
aca-miR-99b-5p_R-1	AACCCGTAGATCCGAACCTGCG	66 212
dre-miR-122_R-1	TGGAGTGTGACAATGGTGTTT	65 298
hsa-miR-30c-5p_R-2	TGTAACATCCTACACTCTCA	50 983
hsa-let-7a-5p	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT	16 623
aca-miR-21-5p	TAGCTTATCAGACTGATGTTGA	16 056
aca-miR-451-5p_R-1	AAACCGTTACCATTACTGAGT	13 687
hhi-miR-26_R-1	TTCAAGTAATCCAGGATAGG	13 098
aca-miR-126-3p_R-1	TCGTACCGTGAGTAATAATGC	11 369
aca-miR-16b-5p	TAGCAGCACGTAATAACTGGAG	8649

регулировать самовосстановление стволовых клеток сперматогониев мышцы и функционирует как антиапоптотический фактор и онкоген, связанный с ростом клеток [34–36]. *Let-7* и члены ее семейства показывают высокий консерватизм у различных видов в плане последовательности и функций. Так, *miR let-7* играет основную роль в тайминге процессов развития у *Caernohabditis elegans* [37].

Консервативные микроРНК присутствуют у многих видов животных и обладают важными функциями в развитии животных и в протекании физиологических процессов [38, 39]. Чтобы идентифицировать консервативные микроРНК в нашем наборе микроРНК, был проведен поиск известных микроРНК, имеющих в базе данных miRBase 21.0, с помощью программы BLAST. У *B. yenyuanensis* всего было выявлено 314 консервативных микроРНК, которые совпадали с микроРНК из других видов. Было показано, что в число первых шести видов входят *Salmo salar*, *Homo sapiens*, *Danio rerio*, *Ictalurus punctatus*, *Xenopus tropicalis* и *Anolis carolinensis* с 314, 279, 227, 216, 173 и 171 консервативными микроРНК соответственно, которые также обнаруживаются у *B. yenyuanensis*. Подробности тэгов секвенированных микроРНК представлены на рис. 2 и в табл. S3 в Приложении, на которой также показаны их статистические показатели. Среди них некоторые сохранившиеся микроРНК были обнаружены у большого разнообразия видов рыб, что указывает на высоко консервативную структуру или на их роль в эволюции.

Выявление новых микроРНК. Одним из наиболее крупных преимуществ глубокого секвенирования является его способность идентифицировать в библиотеке малых РНК новые микроРНК, которые экспрессируются в относительно малых количествах [40]. Чтобы идентифицировать возможные микроРНК, нами был использован

программный пакет «Mireap». С его помощью можно идентифицировать потенциальные структуры типа «стебель–петля» в последовательностях, обрамляющих остающиеся неаннотированные риды [41]. В настоящее время нет данных о геноме *B. yenyuanensis*. Поэтому, в нашей работе неаннотированные малые РНК, которые можно картировать в транскриптах *B. yenyuanensis* (неопубликованные данные), были использованы для предсказания новых микроРНК. В итоге,

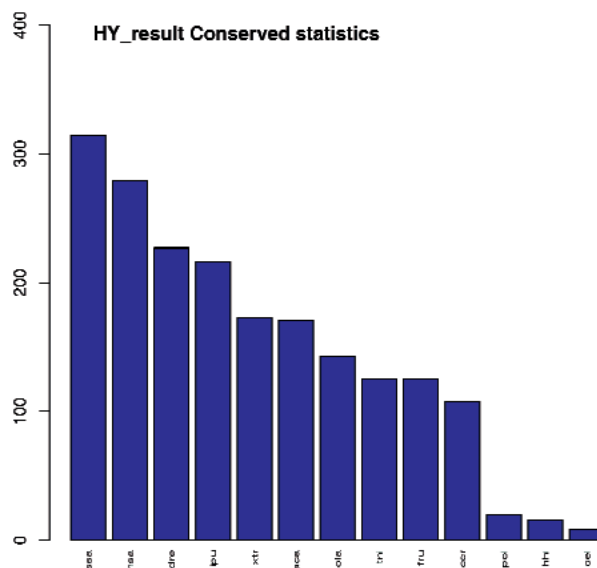


Рис. 2. Сохранение идентифицированных микроРНК у других видов. По оси X отложены запрашиваемые виды; по оси Y отложено число консервативных микроРНК. Частота идентифицированных микроРНК рассчитана путем картирования в 13 видах (горизонтальная ось) в miRbase, и число микроРНК показано по вертикальной оси. Показано до 314 консервативных микроРНК у *B. yenyuanensis* (первый столбик) в сравнении с другими видами. С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: www.elibrary.ru

было предсказано, что 80 вероятных новых микроРНК происходят от предшественников микроРНК, из которых 36 микроРНК берут начало от 3' «руки» и 44 от 5' «руки» (табл. S4 в Приложении). Это указывает на то, что они могут являться видоспецифичными микроРНК в сети регуляции генов. Эти новые микроРНК были названы «предсказываемые кандидаты» (PC, predicted candidate). Длина предшественников, предполагаемых новых микроРНК, варьировала от 50 до 160 н., и длина зрелой микроРНК варьировала от 18 до 26 н., что было сходно с микроРНК, обнаруженными у *Andrias davidianus* и *Xenopus tropicalis* [42, 43]. Значения минимальной свободной энергии сворачивания (MFE – minimum folding free energies) для новых предшественников микроРНК находились в диапазоне от –15,4 до –82,6 ккал/моль со средним значением, равным –37,61 ккал/моль. Содержание G + C для всех 80 предшественников микроРНК колебалось в пределах 24,7–69,8%, и среднее значение составляло 46,7%. Различия в длине, в основном, связано с действием ферментов: редактирование РНК, редактирование 3'-конца и экзонуклеазная активность [44]. В настоящей работе нами также было показано, что для этих РС микроРНК характерны величины ридов в диапазоне 10–310, что является показателем чрезвычайно низкого уровня экспрессии в сравнении с большинством уже известных микроРНК из *B. yenyuanensis*. Этот феномен низкого уровня экспрессии, наблюдаемый для новых микроРНК, соответствует низкому уровню экспрессии микроРНК, вовлеченных в организационный или специальный периоды развития [45, 46].

Кластеры генов микроРНК у *B. Yenyuanensis*. Часто гены микроРНК образуют в геноме кластеры. Кластеры генов микроРНК были показаны у многих видов животных, в том числе у *Salmo salar* и *Gadus morhua* [47, 48]. Экспрессия микроРНК на специфичном кластере может отражать транскрипцию, специфичную для определенной стадии развития, или различный посттранскрипционный процессинг пре-микроРНК [49, 50]. Основываясь на определении в базе данных miRBase, кластер микроРНК должен включать два или более генов микроРНК <10 kb. В соответствии с этим положением, в настоящей работе 14 микроРНК, в том числе 3 консервативных и 11 РС микроРНК, были классифицированы на четыре кластера (табл. 3). Каждый кластер содержал, по крайней мере, две микроРНК. Один из генов новой микроРНК (PC-3p-55105_12) был локализован в кластере генов с тремя другими генами консервативных микроРНК (fru-miR-122_R+2_2, ola-miR-122_R+1_1ss9TC и dre-miR-122_R-1), что указывало на то, что они могут быть функционально сходны и действуют кооперативно в регуляции многочисленных биологических процессов [51]. Кроме того, определенные микроРНК в кластерах генов содержали один и тот же набор контролирующих последовательностей, и они обнаруживались в одном и том же транскрипте. В предыдущей работе было подтверждено, что ген микроРНК может продуцировать две различные микроРНК через транскрипцию дуплекса и таким образом контролировать различные гены-мишени [45]. В настоящей работе нами было высказано предположение, что только четыре кластера могут быть вовлечены в этот феномен. Однако

Таблица 3. Кластеры генов идентифицированных микроРНК

Номер кластера	Входящие в кластер гены микроРНК	Хромосома	Расположение	Цепь
1	PC-3p-55105_12 fru-miR-122_R+2_2 ola-miR-122_R+1_1ss9TC dre-miR-122_R-1	comp10681_c0	431–517 435–513 435–513 437–515	+ + + +
2	PC-3p-46944_13 PC-5p-214997_2 PC-5p-206904_3	comp16424_c0	74–181 74–181 125–293	– – +
3	PC-3p-279899_2 PC-5p-159459_3 PC-5p-206151_3	comp17178_c0	185–343 185–343 217–335	– – +
4	PC-3p-21404_29 PC-5p-48851_14 PC-3p-212673_2 PC-5p-214997_2	comp17272_c0	2961–3126 2961–3126 2994–3118 2994–3118	+ + – –

это нельзя подтвердить из-за того, что нет секвенированного генома и ограничена возможность обнаружения кластеров генов у *B. yenyuanensis*.

Подтверждение уже известных и новых микроРНК с помощью метода количественной ПЦР с обратной транскриптазой типа «стебель–петля» (Stem-loop qRT-PCR). Обычно время и место экспрессии микроРНК строго регулируется, что полезно для понимания их функций [52]. Чтобы идентифицировать присутствие и относительный уровень экспрессии предсказанных микроРНК, для дальнейшего подтверждения с помощью ОТ-ПЦР типа «стебель–петля» нами были случайным образом отобраны шесть известных микроРНК и две новых микроРНК полученных при глубоком секвенировании. Для экспериментального подтверждения использовались те же образцы, что и для глубокого секвенирования. Все микроРНК (*ssa-miR-99-5p_R-1*, *hsa-miR-127-5p_R+1*, *xtr-miR-146b*, *aca-miR-218-5p_R-1*, *tni-miR-375*, *aca-miR-2970-5p*, *PC-5p-4164_155* и *PC-3p-167580_3*) демонстрировали различные уровни экспрессии в сравнении с количеством 16S РНК после нормализации данных (рис. 3, а). Можно также наблюдать аналогичную тенденцию, когда картина экспрессии этих микроРНК на основе результатов проведения количественной ОТ-ПЦР сравнивали с исходными результатами секвенирования микроРНК (рис. 3, б), хотя при этом наблюдались небольшие различия.

Предсказание вероятных генов-мишеней микроРНК с помощью метода онтологии генов (GO) и анализа обогащения путей KEGG. Идентификация мишеней микроРНК является важным этапом в понимании их роли. По крайней мере 118 668 генов-мишеней были предсказаны на основании данных транскриптома *B. yenyuanensis* (неопубликованные данные) с использованием программных пакетов TargetScan и miRanda (табл. S5 в Приложении). В предыдущих работах было показано, что одиночная микроРНК может быть нацелена на мРНК, образуящиеся на одном или сотнях генов, и, время от времени, многочисленные различные микроРНК могут регулировать одну и ту же мРНК [53]. Число вероятных мишеней для единичной микроРНК варьировало от 64 (*xtr-miR-449b-3p_R-2_1ss10AC*) до 444 (*aca-let-7c-1-3p_1ss9CT*). Среднее значение было равно 272 мишеням. Неудивительно, что сеть регуляции генов-мишеней микроРНК была организована очень сложно. В нашей работе предсказанные мишени вовлечены в процессы транскрипции, иммунного ответа, передачи сигнала, метаболизма, транспорта, роста, развития и другие процессы. В число этих мишеней в основном входят: факторы транскрипции, такие как

ассоциированные с генами, кодирующими белки, содержащие домен «цинковый палец», РНК-связывающие белки, активируемые протеиназами рецепторы, факторы инициации трансляции, ГТФ-связывающие ядерные белки, белки, родственные белку Ras, Ras-специфичные активирующие ГТФазу белки, белки, связывающиеся с ТАТА-боксом и белки ядерных рецепторов, которые могут играть критическую регуляторную роль у *B. yenyuanensis*. МикроРНК часто нацелены на гены факторов транскрипции, которые играют роль в жизненной активности живот-

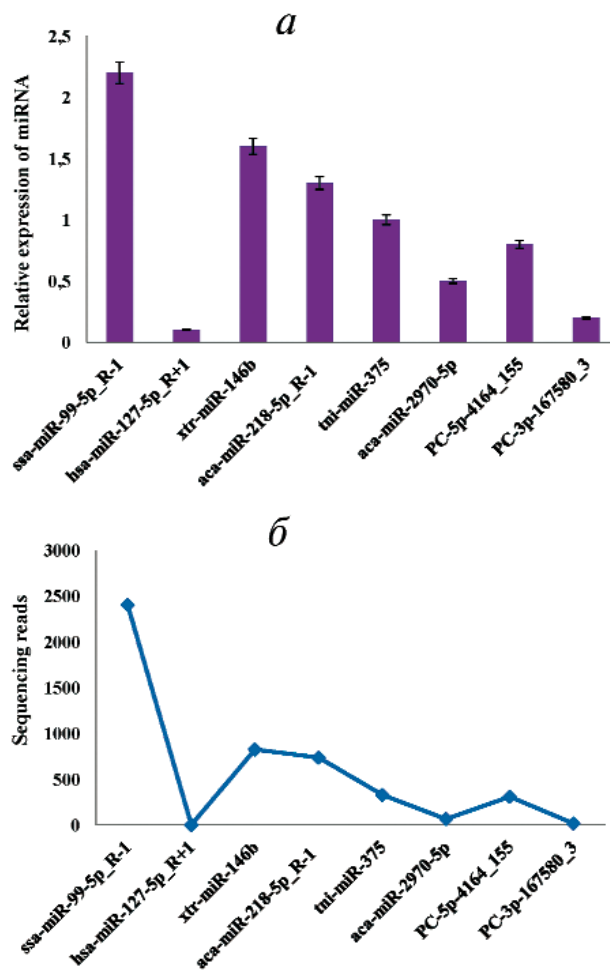
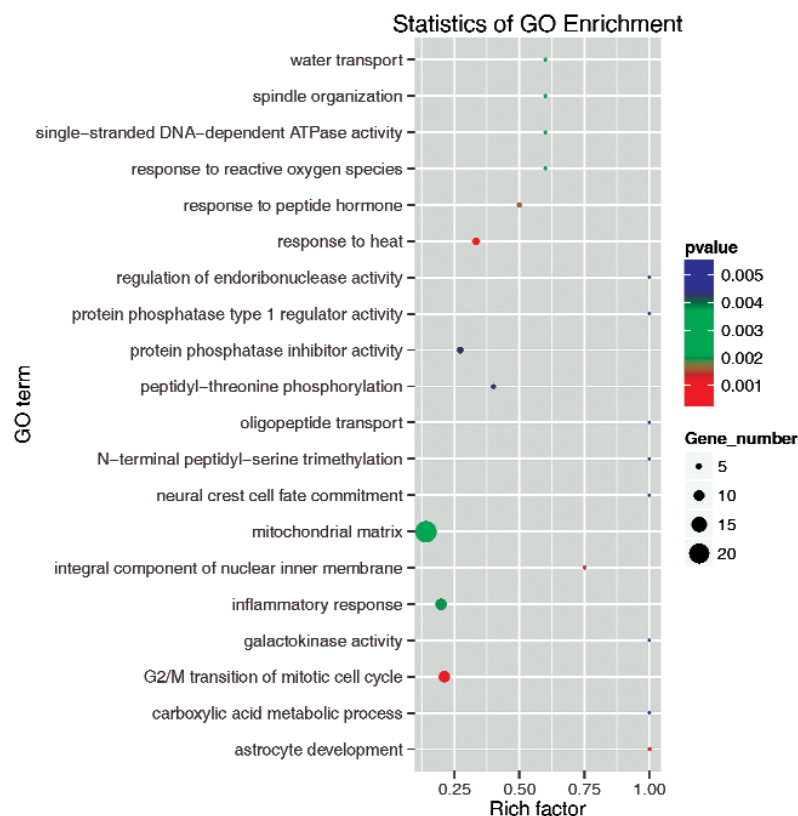


Рис. 3. Валидация отобранных известных и новых микроРНК с помощью метода (кОТ-ПЦР) типа «стебель–петля». *а* – Относительный уровень экспрессии восьми микроРНК (шесть микроРНК и две новых микроРНК) были идентифицированы с помощью (кОТ-ПЦР). *б* – Восемь микроРНК согласно результатам секвенирования демонстрировали сходную картину экспрессии, когда были подтверждены методом кОТ-ПЦР. Уровни транскрипции как известных, так и новых микроРНК были рассчитаны относительно количества 16S РНК после нормализации данных. Результаты ПЦР в реальном времени со столбиками, представляющими среднее значение \pm SD на основании трех независимых экспериментов.

С цветным вариантом рис. 3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: www.elibrary.ru

a



b

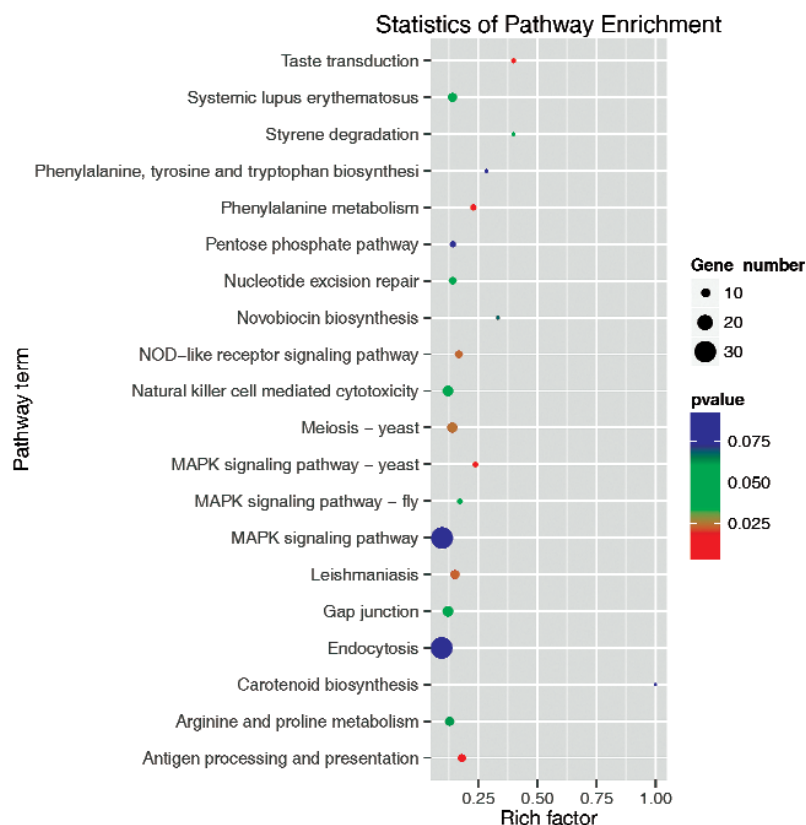


Рис. 4. Топ-20 обогащенных термина (*a*) и путей KEGG (*b*). Число генов: число генов-мишеней в каждом термине или пути. Фактор обогащения: соотношение числа генов-мишеней, поделенное на число всех генов в каждом термине или пути. С цветным вариантом рис. 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: www.elibrary.ru

ных, что указывает на роль микроРНК как регуляторов [54, 55]. Однако необходимо проведение дальнейших исследований, чтобы получить экспериментальные доказательства наличия взаимосвязей между микроРНК и их генами-мишенями у *B. yenyuanensis*. Хотя большое число микроРНК было идентифицировано у животных, тем не менее, микроРНК у саламандр изучались редко, за исключением микроРНК из *Andrias davidianus* (Chinese giant salamander) [56]. Чтобы продолжить изучение возможных физиологических процессов и путей, регулируемых этими идентифицированными микроРНК, их предсказанные гены-мишени были подвергнуты анализу с помощью методов терминов онтологии генов (GO) и путей KEGG. Предсказанные гены-мишени были классифицированы на три основных термина GO: биологические процессы, клеточный компонент и молекулярную функцию. Было, в общей сложности, предсказано 18 741 генов-мишеней, принимающих участие в 3 636 биологических процессах, 15 343 генов-мишеней были вовлечены в 1898 различных молекулярных функций и 14 480 генов-мишеней участвовали в функционировании 735 компонентов клетки (рис. S и табл. S6 в Приложении). Топ-20 обогащенных термина были в основном вовлечены в биологические процессы (везикулярный транспорт, цикл трикарбоновых кислот, сплайсинг РНК, транспорт белков, связанный с белком K48 процесс убиквитинилирования, фолдинг белков, транспорт мРНК, процессинг мРНК, деление ядра при митозе, процесс метаболизма гликогена, переход от фазы G2 к фазе M клеточного цикла и деление клетки), клеточные компоненты (ядрышко, митохондрии, митохондриальный матрикс, меланосома, мембраны эндоплазматического ретикулума, центриоль) и молекулярные функции (связывание РНК и ГТФазная активность) (рис. 4, а).

Все эти результаты подразумевают, что многие гены-мишени функционируют различным образом и взаимозависимо у *B. yenyuanensis*. *B. yenyuanensis* представляет собой вид животных, который входит в число видов, находящихся под угрозой, поэтому мишени, которые задействованы в иммунном ответе, наиболее важны. Например, вирусный миокардит (ko05416), сеть иммунного ответа и продукции IgA (ko04672) и аутоиммунное заболевание щитовидной железы (ko053320). С помощью метода анализа путей KEGG 6082 предсказанных генов-мишеней были сгруппированы в 250 путей. Из них, 39 путей были значительно обогащены (табл. S7 в Приложении). Топ-20 обогащенных термина путей представлены на рис. 4, б. Наиболее значительно обогащенным был путь мейоза в ооците (ko04144), за

которым следовал метаболизм пиримидинов (ko00240) и мейоз (ko04113). Полученные нами результаты также выделили основные биологические пути, связанные с пролиферацией и дифференцировкой клеток гонад, метаболизмом и развитием тканей, что позволяет предположить, что эти мишени, вероятно, вовлечены в процессы высотной адаптации *B. yenyuanensis*.

Несмотря на то, что многие микроРНК были обнаружены в самых разнообразных организмах, исследование микроРНК у *B. yenyuanensis* отстает от других видов животных. В настоящей работе, нами были успешно охарактеризованы 356 уже ранее известных микроРНК и 80 потенциальных микроРНК *B. yenyuanensis*. Уровни экспрессии восьми отобранных микроРНК были подтверждены с помощью метода КОТ-ПЦР «стебель–петля». Всего было предсказано 13 972 генов-мишеней для уже известных и новых микроРНК. Анализ GO и KEGG предполагаемых генов-мишеней показал, что микроРНК регулируют экспрессию генов, вовлеченных в различные физиологические процессы. Результаты настоящей работы расширяют возможности современных публичных баз данных по микроРНК путем размещения последовательностей микроРНК из немодельных видов животных, чей геном до сих пор не секвенирован. Эти данные укрепляют базу для изучения микроРНК и могут внести свой вклад в понимание регуляторной роли микроРНК и их генов-мишеней в развитии иммунного ответа, адаптации к окружающей среде и размножению у *B. yenyuanensis*.

Благодарности

Выполнение настоящей работы проводилось при финансовой поддержке Фонда естественных наук Китая (31471971 и 31402263), Фонда естественных наук провинции Хенань (182300410087) и Фонда Комитета по образованию провинции Хенань (2015GGJS-054).

Соблюдение этических норм

Выполнение данной работы было одобрено комитетом по содержанию и уходу за животными колледжа изучения и разведения животных Хенаньского Университета Науки и Технологий, Хенань, Китай.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Alwin Prem Anand, A., Huber, C., Asnet Mary, J., Gallus, N., Leucht, C., Klafke, R., Hirt, B., and Wizenmann, A. (2018) Expression and function of microRNA-9 in the mid-hindbrain area of embryonic chick, *BMC Dev. Biol.*, **18**, 3, doi: 10.1186/s12861-017-0159-8.
- Sun, K., and Lai, E.C. (2013) Adult-specific functions of animal microRNAs, *Nat. Rev. Genet.*, **14**, 535–548, doi: 10.1038/nrg3471.
- Warf, M.B., Johnson, W.E., and Bass, B.L. (2011) Improved annotation of *C. elegans* microRNAs by deep sequencing reveals structures associated with processing by Drosha and Dicer, *RNA*, **17**, 563–577, doi: 10.1261/rna.2432311.
- Seitz, H., Tushir, J.S., and Zamore, P.D. (2011) A 5'-uridine amplifies miRNA/miRNA* asymmetry in Drosophila by promoting RNA-induced silencing complex formation, *Silence*, **2**, 4, doi: 10.1186/1758-907X-2-4.
- Cambronne, X.A., Shen, R., Auer, P.L., and Goodman, R.H. (2012) Capturing microRNA targets using an RNA-induced silencing complex (RISC)-trap approach, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 20473–20478, doi: 10.1073/pnas.1218887109.
- Ota, H., Sakurai, M., Gupta, R., Valente, L., Wulff, B.E., Ariyoshi, K., Iizasa, H., Davuluri, R.V., and Nishikura, K. (2013) ADAR1 forms a complex with Dicer to promote microRNA processing and RNA-induced gene silencing, *Cell*, **153**, 575–589, doi: 10.1016/j.cell.2013.03.024.
- Luo, J., Wang, Y., Yuan, J., Zhao, Z., and Lu, J. (2018) MicroRNA duplication accelerates the recruitment of new targets during vertebrate evolution, *RNA*, **24**, 787–802, doi: 10.1261/rna.062752.117.
- Krek, A., Grun, D., Poy, M.N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E.J., MacMenamin, P., da Piedade, I., Gunsalus, K.C., Stoffel, M., and Rajewsky, N. (2005) Combinatorial microRNA target predictions, *Nat. Genet.*, **37**, 495–500.
- Ameres, S.L., and Zamore, P.D. (2013) Diversifying microRNA sequence and function, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **14**, 475–488, doi: 10.1038/nrm3611.
- Maltby, S., Plank, M., Tay, H.L., Collison, A., and Foster, P.S. (2016) Targeting microRNA function in respiratory diseases: mini-review, *Front. Physiol.*, **7**, 21, doi: 10.3389/fphys.2016.00021.
- Clark, E.A., Kalomoiris, S., Nolta, J.A., and Fierro, F.A. (2014) Concise review: microRNA function in multipotent mesenchymal stromal cells, *Stem Cells*, **32**, 1074–1082.
- Huang, Y., Shen, X.J., Zou, Q., Wang, S.P., Tang, S.M., and Zhang, G.Z. (2011) Biological functions of microRNAs: a review, *J. Physiol. Biochem.*, **67**, 129–139, doi: 10.1007/s13105-010-0050-6.
- Fu, J., and Zeng, X. (2008) How many species are in the genus *Batrachuperus*? A phylogeographical analysis of the stream salamanders (family Hynobiidae) from southwestern China, *Mol. Ecol.*, **17**, 1469–1488.
- Lu, B., Zheng, Y., Murphy, R.W., and Zeng, X. (2012) Coalescence patterns of endemic Tibetan species of stream salamanders (Hynobiidae: *Batrachuperus*), *Mol. Ecol.*, **21**, 3308–3324, doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05606.
- Huang, Z.S., Yu, F.L., Gong, H.S., Song, Y.L., Zeng, Z.G., and Zhang, Q. (2017) Phylogeographical structure and demographic expansion in the endemic alpine stream salamander (Hynobiidae: *Batrachuperus*) of the Qinling Mountains, *Sci. Rep.*, **7**, 1871, doi: 10.1038/s41598-017-01799-w.
- Jiang, J.P., Jia, J., Zhang, M., and Gao, K.Q. (2018) Osteology of *Batrachuperus londongensis* (Urodela, Hynobiidae): study of bony anatomy of a facultatively neotenic salamander from Mount Emei, Sichuan Province, China, *PeerJ*, **6**, e4517, doi: 10.7717/peerj.4517.
- Che, R., Sun, Y., Wang, R., and Xu, T. (2014) Transcriptomic analysis of endangered Chinese salamander: identification of immune, sex and reproduction-related genes and genetic markers, *PLoS One*, **9**, e87940, doi: 10.1371/journal.pone.0087940.
- Huang, Y., Gong, W., Ren, H., Xiong, J., Gao, X., and Sun, X. (2017) Identification of the conserved and novel microRNAs by deep sequencing and prediction of their targets in Topmouth culter, *Gene*, **626**, 298–304, doi: 10.1016/j.gene.2017.05.052.
- Sui, W., Liu, F., Chen, J., Ou, M., and Dai, Y. (2014) Evaluating a particular circulating microRNA species from an SLE patient using stem-loop qRT-PCR, *Methods Mol. Biol.*, **1134**, 201–209.
- Ju, Z., Jiang, Q., Liu, G., Wang, X., Luo, G., Zhang, Y., Zhang, J., Zhong, J., and Huang, J. (2018) Solexa sequencing and custom microRNA chip reveal repertoire of microRNAs in mammary gland of bovine suffering from natural infectious mastitis, *Anim. Genet.*, **49**, 3–18, doi: 10.1111/age.12628.
- Meng, Y., Tian, H., Hu, Q., Liang, H., Zeng, L., and Xiao, H. (2018) MicroRNA repertoire and comparative analysis of *Andrias davidianus* infected with ranavirus using deep sequencing, *Dev. Comp. Immunol.*, **85**, 108–114, doi: 10.1016/j.dci.2018.04.002.
- Feng, X., Zhou, X., Zhou, S., Wang, J., and Hu, W. (2018) Analysis of microRNA profile of *Anopheles sinensis* by deep sequencing and bioinformatic approaches, *Parasit. Vectors*, **11**, 172, doi: 10.1186/s13071-018-2734-7.
- Chen, X., Li, Q., Wang, J., Guo, X., Jiang, X., Ren, Z., Weng, C., Sun, G., Wang, X., Liu, Y., Ma, L., Chen, J.Y., Zen, K., Zhang, J., and Zhang, C.Y. (2009) Identification and characterization of novel amphioxus microRNAs by Solexa sequencing, *Genome Biol.*, **10**, R78, doi: 10.1186/gb-2009-10-7-r78.
- Cowled, C., Stewart, C.R., Likic, V.A., Friedlander, M.R., Tachedjian, M., Jenkins, K.A., Tizard, M.L., Cottee, P., Marsh, G.A., Zhou, P., Baker, M.L., Bean, A.G., and Wang, L.F. (2014) Characterisation of novel microRNAs in the Black flying fox (*Pteropus alecto*) by deep sequencing, *BMC Genomics*, **15**, 682, doi: 10.1186/1471-2164-15-682.
- Gao, Z.H., Wei, J.H., Yang, Y., Zhang, Z., Xiong, H.Y., and Zhao, W.T. (2012) Identification of conserved and novel microRNAs in *Aquilaria sinensis* based on small RNA sequencing and transcriptome sequence data, *Gene*, **505**, 167–175, doi: 10.1016/j.gene.2012.03.072.
- Ro, S., Song, R., Park, C., Zheng, H., Sanders, K.M., and Yan, W. (2007) Cloning and expression profiling of small RNAs expressed in the mouse ovary, *RNA*, **13**, 2366–2380.
- Michalak, P., and Malone, J.H. (2008) Testis-derived microRNA profiles of African clawed frogs (*Xenopus*) and their sterile hybrids, *Genomics*, **91**, 158–164.
- Bannister, S.C., Tizard, M.L., Doran, T.J., Sinclair, A.H., and Smith, C.A. (2009) Sexually dimorphic microRNA expression during chicken embryonic gonadal development, *Biol. Reprod.*, **81**, 165–176, doi: 10.1095/biolreprod.108.074005.
- Mueller, A.C., Sun, D., and Dutta, A. (2013) The miR-99 family regulates the DNA damage response through its target SNF2H, *Oncogene*, **32**, 1164–1172, doi: 10.1038/onc.2012.131.
- Sun, J., Chen, Z., Tan, X., Zhou, F., Tan, F., Gao, Y., Sun, N., Xu, X., Shao, K., and He, J. (2013) MicroRNA-99a/100 promotes apoptosis by targeting mTOR in human esophageal squamous cell carcinoma, *Med. Oncol.*, **30**, 411, doi: 10.1007/s12032-012-0411-9.
- Dey, B.K., Gagan, J., Yan, Z., and Dutta, A. (2012) MiR-26a is required for skeletal muscle differentiation and regener-

- ation in mice, *Genes Dev.*, **26**, 2180–2191, doi: 10.1101/gad.198085.
32. Zhang, Y.F., Zhang, A.R., Zhang, B.C., Rao, Z.G., Gao, J.F., Lv, M.H., Wu, Y.Y., Wang, S.M., Wang, R.Q., and Fang, D.C. (2013) MiR-26a regulates cell cycle and anoikis of human esophageal adenocarcinoma cells through Rb1-E2F1 signaling pathway, *Mol. Biol. Rep.*, **40**, 1711–1720, doi: 10.1007/s11033-012-2222-7.
 33. Bouhallier, F., Allioli, N., Lavial, F., Chalmel, F., Perrard, M.H., Durand, P., Samarut, J., Pain, B., and Rouault, J.P. (2010) Role of miR-34c microRNA in the late steps of spermatogenesis, *RNA*, **16**, 720–731, doi: 10.1261/rna.1963810.
 34. Niu, Z., Goodyear, S.M., Rao, S., Wu, X., Tobias, J.W., Avarbock, M.R., and Brinster, R.L. (2011) MicroRNA-21 regulates the self-renewal of mouse spermatogonial stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 12740–12745, doi: 10.1073/pnas.1109987108.
 35. Si, M.L., Zhu, S., Wu, H., Lu, Z., Wu, F., and Mo, Y.Y. (2007) MiR-21-mediated tumor growth, *Oncogene*, **26**, 2799–2803.
 36. Liu, H., Cheng, L., Cao, D., and Zhang, H. (2018) Suppression of miR-21 expression inhibits cell proliferation and migration of liver cancer cells by targeting Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN), *Med. Sci. Monit.*, **24**, 3571–3577, doi: 10.12659/MSM.907038.
 37. Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, **403**, 901–906.
 38. Tan, T.T., Chen, M., Harikrishna, J.A., Khairuddin, N., Mohd Shamsudin, M.I., Zhang, G., and Bhassu, S. (2013) Deep parallel sequencing reveals conserved and novel miRNAs in gill and hepatopancreas of giant freshwater prawn, *Fish Shellfish Immunol.*, **35**, 1061–1069, doi: 10.1016/j.fsi.2013.06.017.
 39. Yakovlev, I.A., and Fossdal, C.G. (2017) *In silico* analysis of small RNAs suggest roles for novel and conserved miRNAs in the formation of epigenetic memory in somatic embryos of Norway spruce, *Front. Physiol.*, **8**, 674, doi: 10.3389/fphys.2017.00674.
 40. Juan, L., Tong, H.L., Zhang, P., Guo, G., Wang, Z., Wen, X., Dong, Z., and Tian, Y.P. (2014) Identification and characterization of novel serum microRNA candidates from deep sequencing in cervical cancer patients, *Sci. Rep.*, **4**, 6277, doi: 10.1038/srep06277.
 41. Jiang, P., Wu, H., Wang, W., Ma, W., Sun, X., and Lu, Z. (2007) MiPred: classification of real and pseudo microRNA precursors using random forest prediction model with combined features, *Nucleic Acids Res.*, **35**, W339–W344.
 42. Huang, Y., Ren, H.T., Xiong, J.L., Gao, X.C., and Sun, X.H. (2017) Identification and characterization of known and novel microRNAs in three tissues of Chinese giant salamander base on deep sequencing approach, *Genomics*, **109**, 258–264, doi: 10.1016/j.ygeno.2017.04.007.
 43. Harding, J.L., Horswell, S., Heliot, C., Armisen, J., Zimmerman, L.B., Luscombe, N.M., Miska, E.A., and Hill, C.S. (2014) Small RNA profiling of *Xenopus* embryos reveals novel miRNAs and a new class of small RNAs derived from intronic transposable elements, *Genome Res.*, **24**, 96–106, doi: 10.1101/gr.144469.112.
 44. Islam, M.T., Ferdous, A.S., Najnin, R.A., Sarker, S.K., and Khan, H. (2015) High-throughput sequencing reveals diverse sets of conserved, nonconserved, and species-specific miRNAs in jute, *Int. J. Genomics*, **2015**, 125048, doi: 10.1155/2015/125048.
 45. Zhang, J., Liu, Y., Zhang, X., Pan, J., Nie, Z., Zhang, W., Yu, W., Chen, J., Liu, L., Li, J., Zhang, Y., Guo, J., Wu, W., Zhu, H., and Lv, Z. (2013) The identification of microRNAs in the whitespotted bamboo shark (*Chiloscyllium plagiosum*) liver by Illumina sequencing, *Gene*, **527**, 259–265, doi: 10.1016/j.gene.2013.06.012.
 46. Huang, S., Cao, X., Tian, X., and Wang, W. (2016) High-throughput sequencing identifies microRNAs from posterior intestine of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) and their response to intestinal air-breathing inhibition, *PLoS One*, **11**, e0149123, doi: 10.1371/journal.pone.0149123.
 47. Andreassen, R., Worren, M.M., and Hoyheim, B. (2013) Discovery and characterization of miRNA genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) by use of a deep sequencing approach, *BMC Genomics*, **14**, 482, doi: 10.1186/1471-2164-14-482.
 48. Andreassen, R., Rangnes, F., Sivertsen, M., Chiang, M., Tran, M., and Worren, M.M. (2016) Discovery of miRNAs and their corresponding miRNA genes in Atlantic Cod (*Gadus morhua*): use of stable miRNAs as reference genes reveals subgroups of miRNAs that are highly expressed in particular organs, *PLoS One*, **11**, e0153324, doi: 10.1371/journal.pone.0153324.
 49. Bartel, D.P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell*, **116**, 281–297.
 50. Hoss, A.G., Kartha, V.K., Dong, X., Latourelle, J.C., Dumitriu, A., Hadzi, T.C., Macdonald, M.E., Gusella, J.F., Akbarian, S., Chen, J.F., Weng, Z., and Myers, R.H. (2014) MicroRNAs located in the *Hox* gene clusters are implicated in Huntington's disease pathogenesis, *PLoS Genet.*, **10**, e1004188, doi: 10.1371/journal.pgen.1004188.
 51. Castellano, L., Rizzi, E., Krell, J., Di Cristina, M., Galizi, R., Mori, A., Tam, J., De Bellis, G., Stebbing, J., Crisanti, A., and Nolan, T. (2015) The germline of the malaria mosquito produces abundant miRNAs, endo-siRNAs, piRNAs and 29-nt small RNAs, *BMC Genomics*, **16**, 100, doi: 10.1186/s12864-015-1257-2.
 52. Xia, J.H., He, X.P., Bai, Z.Y., and Yue, G.H. (2011) Identification and characterization of 63 MicroRNAs in the Asian seabass *Lates calcarifer*, *PLoS One*, **6**, e17537, doi: 10.1371/journal.pone.0017537.
 53. Samad, A.F.A., Nazaruddin, N., Murad, A.M.A., Jani, J., Zainal, Z., and Ismail, I. (2018) Deep sequencing and *in silico* analysis of small RNA library reveals novel miRNA from leaf *Persicaria* minor transcriptome, *3 Biotech*, **8**, 136, doi: 10.1007/s13205-018-1164-8.
 54. Alizadeh, E., Akbarzadeh, A., Eslaminejad, M. B., Barzegar, A., Hashemzadeh, S., Nejati-Koshki, K., and Zarghami, N. (2015) Up regulation of liver-enriched transcription factors HNF4a and HNF6 and liver-specific microRNA (miR-122) by inhibition of let-7b in mesenchymal stem cells, *Chem. Biol. Drug Des.*, **85**, 268–279, doi: 10.1111/cbdd.12398.
 55. Ow, M.C., Martinez, N.J., Olsen, P.H., Silverman, H.S., Barrasa, M., Conradt, B., Walhout, A.J., and Ambros, V. (2008) The FLYWCH transcription factors FLH-1, FLH-2, and FLH-3 repress embryonic expression of microRNA genes in *C. elegans*, *Genes Dev.*, **22**, 2520–2534, doi: 10.1101/gad.1678808.
 56. Su, S., Wang, Y., Wang, H., Huang, W., Chen, J., Xing, J., Xu, P., Yuan, X., Huang, C., and Zhou, Y. (2018) Comparative expression analysis identifies the respiratory transition-related miRNAs and their target genes in tissues of metamorphosing Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*), *BMC Genomics*, **19**, 406, doi: 10.1186/s12864-018-4662-5.

**DISCOVERY OF MicroRNAs
FROM *Batrachuperus yenyuanensis* USING
DEEP SEQUENCING AND PREDICTION
OF THEIR TARGETS**

Y. Huang^{1*}, J. Xiong^{1*}, P. B. Brown², and X. Sun¹

¹ College of Animal Science and Technology, Henan University
of Science and Technology, Luoyang 471023, China;
E-mail: huangyong1979111@126.com, xjlpanda@126.com

² Department of Forestry and Natural Resources,
Purdue University, West Lafayette, 47907 Indiana, USA

Received July 14, 2018

Revised October 29, 2018

Accepted October 29, 2018

MicroRNAs (miRNAs), a family of ~22 nucleotide non-coding single-stranded RNA molecules, are considered as key post-transcriptional regulators of gene expression that regulate various biological processes in living organism. Many miRNAs have been identified in animals; however, few have been reported in Hynobiidae species. The present study is aimed to identify a full repertoire of miRNAs in *Batrachuperus yenyuanensis* (Yenyuan stream salamander), which would significantly increase our knowledge of miRNAs in amphibians. A small RNA library was constructed from *B. yenyuanensis* and sequenced using deep sequencing. As a result, 1,717,751 clean reads were obtained, representing 356 known and 80 novel miRNAs. Additionally, expression levels of eight randomly selected miRNAs in *B. yenyuanensis* were confirmed using the stem-loop quantitative real-time reverse transcription PCR. In addition, 13,972 targets were predicted for these identified miRNAs, although the physiological functions of many of these targets remain unknown. Gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis suggested that the predicted targets are involved in a variety of physiological regulatory functions in *B. yenyuanensis*. These results provided useful information for further research on the miRNAs involved in the growth and development of *B. yenyuanensis*, as well as adaptation of this species to its high-altitude habitats.

Keywords: *Batrachuperus yenyuanensis*, microRNA, deep sequencing, testis, stem-loop RT-qPCR