

降解组测序与剪切位点分析研究进展

崔东亚¹, 杨美玲²

(1. 运城学院生命科学系, 山西运城 044000; 2. 运城学院应用化学系, 山西运城 044000)

摘要:动植物细胞内都存在大量的 microRNA(miRNA), miRNA 的功能之一是通过互补指导内切酶切割与之互补的 mRNA, 对该 mRNA 进行转录后调控。但 miRNA 与靶基因之间并不是完全互补, 所以通过序列计算方式预测的靶基因中假阳性也是很高的。单独验证预测的靶基因不能确定是否正确且费时费力, 高通量测序与计算预测结合可以很好地验证和发现 miRNA 的靶基因。介绍了寻找 miRNA 靶基因的降解组测序方法, 包括降解组测序的方法原理、试验流程、miRNA 靶基因寻找等主要环节。经研究发现, 降解组测序已经成为寻找 miRNA 靶基因的常用方法。

关键词:降解组; miRNA; 靶基因; 剪切位点; 研究进展

中图分类号: Q754 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)07-0056-04

microRNAs(miRNAs)是一类具有特殊功能的小 RNA, 约为 22 个核苷酸, 具有抑制蛋白质编码基因的功能^[1], 一些茎环结构的 RNA 在核酸酶的作用下将茎环结构的 RNA 剪切加工成 miRNA。成熟的 miRNA 与 argonaute(AGO)蛋白结合形成沉默复合体, miRNA 与靶基因互补, AGO 蛋白则催化剪切靶基因, 抑制靶基因翻译蛋白质^[2]。

在动物体内 RNA 剪切活性来自 argonaute2(AGO2), 在 5' 剪切片段留下 3' 末端羟基(3'-OH), 在 3' 剪切片段留下 5' 末端单磷酸(5'-p)^[3-4], 但是在动物体内已证实的 miRNA 的靶基因还很少^[5-6]。尽管如此, 人工构建的 siRNA(small interfering RNAs)同样可以依据 miRNA 类似的机制, 将靶基因沉默, 目前已经成为研究靶基因功能的常用试验技术。

动物的 miRNA 通常只有部分序列是可以与靶基因完美互补配对的, 这段完美互补配对的序列通常是 miRNA 的第 2 个至第 7 个碱基, miRNA 中这段与靶基因完全互补的序列为“种子序列”^[7-8]。miRNA 的 3' 非种子端序列在一定程度上有增强 miRNA 对靶基因识别的作用^[8]。研究发现, 一些非 miRNA 靶基因也含有 1 个或多个 miRNA 结合区域, 为了避免非 miRNA 靶基因也被 miRNA 剪切, 对非 miRNA 靶基因的保护机制也发生了进化^[9-10], 但是当导入 1 个 siRNA/miRNA 或敲除 1 个内源 miRNA 仍然可以引起很多基因表达变化, 这些表达变化的基因中包含 miRNA 剪切的靶基因^[11-13]。

植物中 miRNA 靶基因研究相对比较, 因为 miRNA 与靶基因互补的现象非常多, 且 miRNA 切割位点比较固定, 通常位于 mRNA-miRNA 互补区域, 从 miRNA 5' 端算起, 切割位点位于第 10 个和第 11 个核苷酸之间^[14-15]。miRNA 调控靶基因的方式也很多, 1 个 miRNA 可以调控多个靶基因, 同时多个 miRNA 也可以调控同一靶基因。总之, 在研究 miRNA 功能过程中寻找和鉴定 miRNA 的靶基因非常有必要。

新一代测序可以一次性测定百万级的序列, 也可以根据不同需要测定特定类型的 RNA, 是研究转录组表达和表达调

控革命性的技术革新^[11]。近几年, 新一代测序技术被广泛应用, 如寻找新的 miRNA^[12]。由于植物中 miRNA 降解靶基因的机制相对比较清晰, 所以新一代测序在分析 mRNA 降解片段中应用较多。借助于高通量测序分析 miRNA 靶基因的植物有拟南芥、玉米、棉花、草莓、番茄、葡萄、黄瓜、杨树、红豆杉、蝴蝶兰和线虫等众多物种^[13-23]。

如何获得 miRNA 及其降解位点是研究 miRNA 功能的前提。miRNA 通过互补方式识别靶基因, 并将靶基因切割。所以, 传统的研究方法是通过计算机预测和后续的试验验证^[5], 在验证过程中须要获得 mRNA 的 5' 末端序列; 常规方法是通过 5'-RACE 技术^[24-25], 该技术首先利用 poly(A) 分离得到 mRNA, 去掉 mRNA 的帽子结构并加 1 个 5' 接头序列, 或者直接在 mRNA 5' 末端加入接头。根据接头序列和 oligo(dT) 或特定序列, PCR 扩增可以获得 mRNA 全部或部分序列, 通过 Sanger 测序可以获得 mRNA 转录起始位点序列。通过 5'-RACE 技术即可以找到 mRNA 转录起始序列^[26-27], 也可以用于 mRNA 的切割序列分离^[24]。通常通过 miRNA 预测靶基因, 然后用 5'-RACE 对预测的 mRNA 开展剪切位点研究, 即寻找或验证某个特定的 mRNA 的 5' 末端序列。

RACE 方法是分析 RNA 末端的常用方法^[24], 新一代测序可以测定百万条序列^[28]。将二者结合, 能一次性测得所有 RNA 的末端序列, 辅以生物软件分析末端序列, 可以同时验证所有预测的靶基因^[29]。这样不仅可以大大提高工作效率, 而且还可以从降解片段入手寻找新的 miRNA^[35-36]。

1 MmE I 内切酶和降解组建库流程

1.1 MmE I 是降解组测序重要的酶

降解组分析中的关键是如何找到 miRNA-AGO 复合物切割的 mRNA 片段, 获得 mRNA 切割位点序列, 无非是获得切割位点处的序列。3' 切割片段是 mRNA 切割产物之一, 其 5' 末端是单磷酸结构, 3' 末端具有 poly(A) 结构。测定这样的序列, 可以发现所有被剪切的 mRNA 序列。但这样的序列太长, 超出了新一代测序技术的要求。通过化学方法将序列打断, 又会将切割位点序列淹没在众多序列之中, 造成背景噪音过大。

收稿日期: 2013-10-26

作者简介: 崔东亚(1978—), 男, 河北满城人, 硕士, 讲师, 主要从事分子生物教学与研究。E-mail: dongyacui@163.com。

Mme I 从嗜甲基菌 (*Methylophilus methylotrophus*) 中分离得到, 属于 II 型限制性内切酶。在非回文 DNA 序列上, *Mme* I 识别 5'-TCCRAC-3' 序列 (R 表示 G 或 A), 在识别位点下游 20 bp 处将双链 DNA 切割, 并在识别序列留下 2 个碱基的黏性末端。*Mme*I 的识别序列为 5'-TCCRAC(N)₂₀-3'^[30]。*Mme* I 可以单一地将 DNA 的切割序列截取下来, 单一测定切割位点序列。所以, *Mme* I 是降解组测序过程中的关键酶。

1.2 降解组测序技术路线

降解组分析主要分成 RNA 建库测序与数据分析 2 个部分。其中, RNA 建库是 RNA 测序前的 RNA 处理过程。RNA

建库很关键, 测序目的不同, RNA 建库方法也不同^[31-32]。根据目的 RNA 特点, 设计特征的 RNA 建库路线, 富集获得感兴趣的 RNA, 即富集目的 RNA 过程中同时也在去除污染 RNA。降解组测序 RNA 处理过程有别于其他类型的 RNA 处理, 降解组测序 RNA 处理过程的实质是获得被 miRNA 切割的 mRNA 产物^[33-34]。通常 mRNA 5' 末端具有帽子结构, 3' 端具有 poly(A) 结构, mRNA 被剪切后, 形成 2 种剪切产物, 即 5' 剪切片段和 3' 剪切片段。降解组测序就是要提取 3' 剪切片段, 3' 剪切片段的 5' 具单磷酸结构, 3' 末端具有 poly(A) 结构^[34]。根据 3' 剪切片段特定设计 RNA 建库流程 (图 1)。

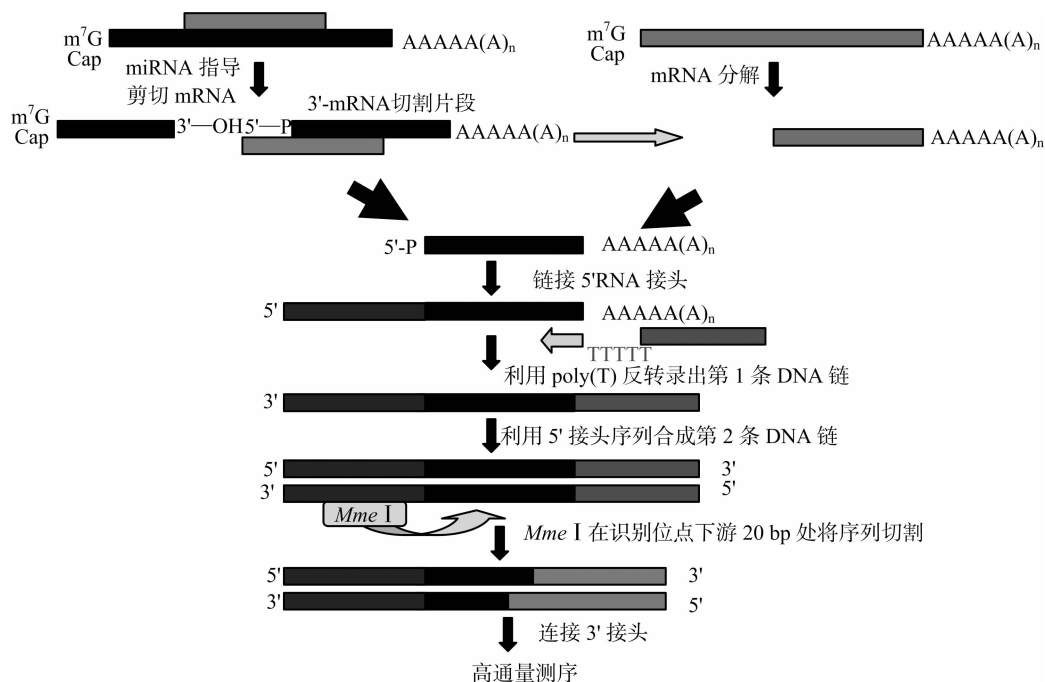


图1 降解组测序建库过程^[34]

1.2.1 降解组测序基本设计思路 第一, 根据 poly(A) 尾巴可将所有带有 poly(A) 尾巴的 RNA 分离得到, 带有 poly(A) 尾巴的 RNA 主要有完整的 mRNA 和 3' 剪切片段 2 种。第二, 在 3' 剪切片段 5' 末端加入 RNA 接头。完整的 mRNA 5' 末端为帽子结构, 3' 剪切片段的 5' 末端为单磷酸。只有单磷酸结构的 RNA 可以与 5' 接头相连接^[35]。5' 接头序列带有 *Mme* I 识别位点, 如拟南芥降解组分中 5' RNA 接头: 5'-GUUCAGAGUUCUACAGUCCGAC-3', 粗体标记为 *Mme* I 内切酶识别序列^[33]。第三, 反转录 RNA 为 DNA。即根据接头序列和 oligo(dT) 将 3' 剪切片段反转录为双链 DNA 序列。第四, 酶切获得 3' 剪切片段的 5' 末端序列 (即切割位点序列)。因为在接头序列中预先引入 *Mme* I 识别位点, 带有接头的序列会被 *Mme* I 切割生成 40 bp 左右的序列 (含接头序列)。第五, 在 *Mme* I 酶切位点加入 DNA 接头。*Mme* I 酶切后, 分离酶切序列, 在 *Mme*I 切割位点处连接双链 DNA 接头, 如拟南芥双链 DNA 接头为 5'-TCGTATGCCGTCTCTGCTTG-3' 和其互补链 3'-NNAGCATACGGCAGAAGACGAAC-5'^[33]。第六, 纯化带有双链 DNA 接头的序列, 按照新一代测序流程进行测序。

1.2.2 降解组测序设计原理 通过 mRNA 的结构特征、

miRNA 调控靶基因特征以及结合新一代测序技术来实现。将测序数据回帖转录组, 深入比对分析, 如果在 mRNA 序列的某个位点发现 1 个回帖比对峰值, 该峰值就是候选的 miRNA 剪切位点, 于是从试验中找到了 miRNA 的作用靶基因。

1.3 降解组数据分析基本流程

高通量建库和测序可以交由测序公司负责处理, 因为建库、测序所需要的试剂和设备非常昂贵, 有公司负责建库和测序相对比较便宜, 而且现在的降解组测序技术已经非常成熟, 国内也涌现出多家测序公司, 甚至一些大型的科研单位自己就可以直接开展测序服务。但降解组数据分析过程则要求科研人员要熟悉 miRNA 调控切割靶基因的基本过程, 尤其是具备一定的数据处理分析能力。

通过降解组分析可以很轻松地发现 miRNA 的降解片段, 而且也可以根据降解片段发现新的 miRNA。降解组数据分析基本分为以下几个过程 (图 2)。

1.3.1 获得 clean 数据 所谓 clean 数据是指去除测序接头序列和低质量序列。如果是由公司测序, 一般可以直接从测序公司获得 clean 数据, 将 clean 数据直接用于下一步分析。但 NCBI 上下载的数据中有时也有测序的原始数据, 利用这

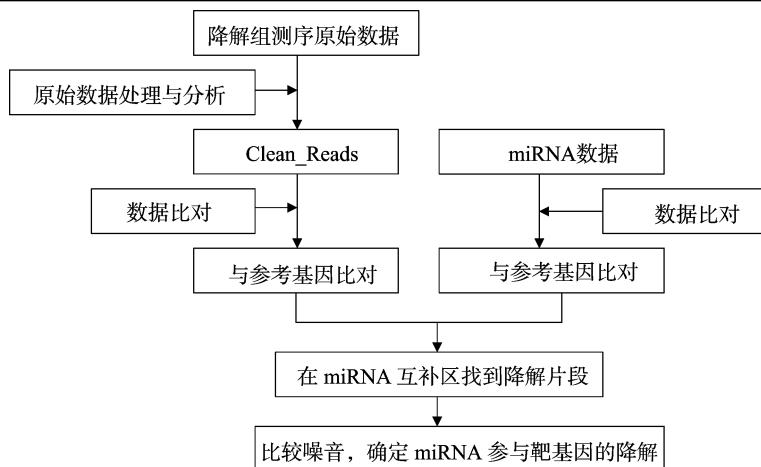


图2 降解组数据分析流程示意图

些数据分析之前则须要进行数据预处理,基本过程包括:去除测序接头序列、去除简单重复序列、去除带有不确定碱基的序列、测序质量分析等。结合软件操作可以轻松实现数据处理,如 FASTQ/A Clipper、cutadapt 等。

1.3.2 序列比对 从 miRNA 数据库中找到 miRNA 的序列,与 clean 数据分别与参考基因匹配,分析每种序列和 miRNA 的匹配位点。编写脚本程序,找到 miRNA 匹配位点附近的降解片段。因为降解片段来自 mRNA 降解,miRNA 与 mRNA 互补,根据这个特征找到降解片段剪切位置周围是否有互补 miRNA 存在。如果存在 miRNA,计算 miRNA 周围降解片段

数量。序列匹配软件很多,常用的有 BOWTIE^[36]、SOAP2^[37]、BWA^[38]等。

1.3.3 获得靶基因 如果 miRNA 互补区域内存在一个明显的降解片段峰值,则说明该基因很有可能是与之互补的 miRNA 靶基因,通过与周围噪音相比,确定该基因为 miRNA 的疑似靶基因。

1.3.4 图片展示 将找到的候选靶基因、miRNA 和降解片段位置和数量,通过图展示出来,如常用 t - plot 展示,t - plot 展示可采用 R 语言绘制;也可以用一般作图软件实现如 Excel (图 3)。

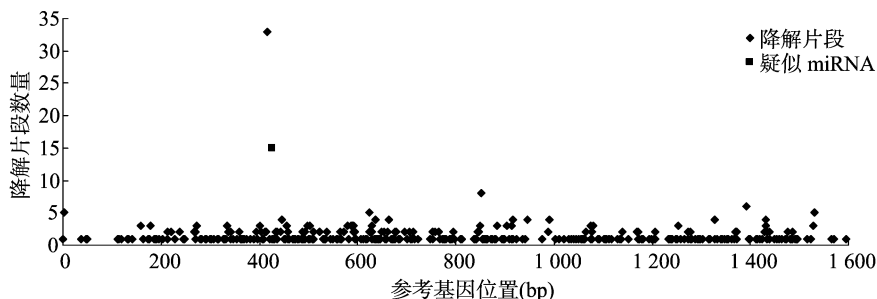


图3 miRNA 与靶基因降解片段在靶基因位置上的分布

2 结论与讨论

miRNA 是一类非常重要的调控小 RNA,通过剪切 mRNA 来调控靶基因的功能,达到调节生理代谢或发育的目的。miRNA 及其调控序列的发现,有助于深入了解 miRNA 的功能。然而,miRNA 调控网络极其复杂,miRNA 仅仅通过种子的区域序列就可以达到调控靶基因的功能,所有 mRNA 可同时受到多种小 RNA 的调控,或同一种小 RNA 在同一 mRNA 上有多个的靶位点,这会给降解组分析带来一定的困难。同时,近年来涌现出来其他类型的小 RNA,如 22G - RNA、26G - RNA、piRNA 等小 RNA^[39]。这些小 RNA 是否直接参与 mRNA 的调控还不清楚,但果蝇 piRNA 可以通过与转座子 RNA 序列互补,指导内切酶将转座子 RNA 切割,阻止转座子转座。但在线虫中,piRNA 并不直接参与靶基因的沉默,而是诱导次级小 RNA 22G - RNA 生成,这些次级 22G - RNA 调控互补序列沉默,22G - RNA 是否直接参与靶基因的切割还不

清楚。但有研究发现,一些次级 siRNA 也可以切割靶基因^[40]。小 RNA 如何调控靶基因一直是研究的热点之一,其中小 RNA 参与靶基因的切割是研究的一个方向。现在有多网站提供 miRNA 靶基因的预测服务^[5,41-43],但预测的结果需要试验验证。理论上降解组测序几乎可以一次性验证所有预测的靶基因,可以将预测的靶基因从试验角度加以证实。降解组测序实质是测定具有一定特征的 RNA 5' 末端序列,这类 RNA 特征是 5' 末端具有单磷酸且 3' 末端具有 poly(A)^[34]。这类 RNA 可以是来自 miRNA 指导的 mRNA 切割产物,也可以是来自 mRNA 的分解产物^[44]。当 miRNA 的靶基因表达量不高或 mRNA 分解产物过高时,非特异性的 mRNA 降解片段容易检测到,背景噪音过高,会对 miRNA 靶基因分析带来困难。但测序技术也在不断提高,相应分析方法也在升级,高通量测序与数据分析技术已经成为生物试验中的常规试验检测分析方法。

参考文献:

- [1] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281–297.
- [2] Filipowicz W, Bhattacharyya S N, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight[J]. Nature Reviews Genetics, 2008, 9(2): 102–114.
- [3] Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, et al. Human argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs[J]. Molecular Cell, 2004, 15(2): 185–197.
- [4] Schwarz D S, Tomari Y, Zamore P D. The RNA-induced silencing complex is a Mg^{2+} -dependent endonuclease[J]. Current Biology, 2004, 14(9): 787–791.
- [5] Xiao F F, Zuo Z X, Cai G S, et al. MiRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37(Database issue): D105–D110.
- [6] Jones-Rhoades M W, Bartel D P, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants[J]. Annu Rev Plant Biol, 2006, 57: 19–53.
- [7] Lewis B P, D P Bartel C S. Often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. Cell, 2005, 120(1): 15–20.
- [8] Bartel D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. Cell, 2009, 136(2): 215–233.
- [9] Farh K K, Grimson A, Jan C, et al. The widespread impact of mammalian microRNAs on mRNA repression and evolution[J]. Science, 2005, 310(5755): 1817–1821.
- [10] Friedman R C, Farh K K, Burge C B, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs[J]. Genome Research, 2009, 19(1): 92–105.
- [11] Reis-Filho J S. Next-generation sequencing[J]. Breast Cancer Res, 2009, 11(增刊): 12–19.
- [12] Moxon S, Jing R C, Szitty G, et al. Deep sequencing of tomato short RNAs identifies microRNAs targeting genes involved in fruit ripening[J]. Genome Research, 2008, 18(10): 1602–1609.
- [13] Karlova R, van Haarst J C, Maliepaard C, et al. Identification of microRNA targets in tomato fruit development using high-throughput sequencing and degradome analysis[J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(7): 1863–1878.
- [14] Zhao Y P, Xu Z H, Mo Q C, et al. Combined small RNA and degradome sequencing reveals novel miRNAs and their targets in response to low nitrate availability in maize[J]. Annals of Botany, 2013, 112(3): 633–642.
- [15] Yang X Y, Wang L C, Yuan D J, et al. Small RNA and degradome sequencing reveal complex miRNA regulation during cotton somatic embryogenesis[J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(6): 1521–1536.
- [16] Xu X B, Yin L L, Ying Q C, et al. High-throughput sequencing and degradome analysis identify miRNAs and their targets involved in fruit senescence of *Fragaria ananassa*[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e70959.
- [17] Shuai P, Liang D, Zhang Z J, et al. Identification of drought-responsive and novel populus trichocarpa microRNAs by high-throughput sequencing and their targets using degradome analysis[J]. BMC Genomics, 2013, 14(6): 233.
- [18] Mao W H, Li Z Y, Xia X J, et al. A combined approach of high-throughput sequencing and degradome analysis reveals tissue specific expression of microRNAs and their targets in cucumber[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e33040.
- [19] Hao D C, Yang L, Xiao P G, et al. Identification of taxus microRNAs and their targets with high-throughput sequencing and degradome analysis[J]. Physiologia Plantarum, 2012, 146(4): 388–403.
- [20] An F M, Chan M T. Transcriptome-wide characterization of miRNA-directed and non-miRNA-directed endonucleolytic cleavage using degradome analysis under low ambient temperature in *Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana*[J]. Plant & Cell Physiology, 2012, 53(10): 1737–1750.
- [21] Pantaleo V, Szitty G, Moxon S, et al. Identification of grapevine microRNAs and their targets using high-throughput sequencing and degradome analysis[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2010, 62(6): 960–976.
- [22] Addo-Quaye C, Eshoo T W, Bartel D P, et al. Endogenous siRNA and miRNA targets identified by sequencing of the *Arabidopsis* degradome[J]. Current Biology, 2008, 18(10): 758–762.
- [23] Park J H, Ahn S, Kim S, et al. Degradome sequencing reveals an endogenous microRNA target in *Caenorhabditis elegans*[J]. FEBS Letters, 2013, 587(7): 964–969.
- [24] Yekta S, Shih I H, Bartel D P. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA[J]. Science, 2004, 304(5670): 594–596.
- [25] Sambrook J, Russell D W. Rapid amplification of 5' cDNA ends (5'-RACE)[J]. CSH Protocols, 2006(1): 3989–3993.
- [26] Pinto F L, Lindblad P. A guide for in-house design of template-switch-based 5' rapid amplification of cDNA ends systems[J]. Analytical Biochemistry, 2010, 397(2): 227–232.
- [27] Dallmeier K, Neyts J. Simple and inexpensive three-step rapid amplification of cDNA 5' ends using 5' phosphorylated primers[J]. Analytical Biochemistry, 2013, 434(1): 1–3.
- [28] Metzker L M. Sequencing technologies – the next generation[J]. Nature Reviews Genetics, 2010, 11(1): 31–46.
- [29] Cheng L, Quek C Y, Sun X, et al. The detection of microRNA associated with Alzheimer's disease in biological fluids using next-generation sequencing technologies[J]. Frontiers in Genetics, 2013, 4(1): 150.
- [30] Boyd A C, Charles I G, Keyte J W, et al. Isolation and computer-aided characterization of MmeI, a type II restriction endonuclease from *Methylophilus methylotrophus*[J]. Nucleic Acids Research, 1986, 14(13): 5255–5274.
- [31] Malone C, Brennecke J, Czech B, et al. Preparation of small RNA libraries for high-throughput sequencing[J]. Cold Spring Harbor Protocols, 2012(10): 1067–1077.
- [32] Christodoulou D C, Gorham J M, Herman D S, et al. Construction of normalized RNA-seq libraries for next-generation sequencing using the crab duplex-specific nuclease[M]. New York: John Wiley & Sons Inc, 2011: 12–16.
- [33] German M A, Pillay M, Jeong D H, et al. Global identification of microRNA-target RNA pairs by parallel analysis of RNA ends[J]. Nature Biotechnology, 2008, 26(8): 941–946.
- [34] German M A, Luo S J, Schroth G, et al. Construction of parallel analysis of RNA ends (PARE) libraries for the study of cleaved miRNA targets and the RNA degradome[J]. Nature Protocols, 2009, 4(3): 356–362.

胡伟,陈豫,伍洋. 不同激素浓度配比对萝卜愈伤组织形成的影响[J]. 江苏农业科学,2014,42(7):60-62.

不同激素浓度配比对萝卜愈伤组织形成的影响

胡伟,陈豫,伍洋

(宜宾学院生命科学与食品工程学院,四川宜宾 644000)

摘要:以萝卜直根形成层为试验材料,比较不同激素 NAA、2,4-D 和 6-BA 浓度配比对萝卜外植体形成愈伤组织诱导率和质量的影响。结果表明:(1)与不添加任何激素相比,不同激素浓度配比对萝卜愈伤组织诱导效果明显。(2)6-BA 分别与 NAA、2,4-D 配比诱导萝卜愈伤组织的比较表明,2,4-D 较 NAA 更适于诱导萝卜愈伤组织。(3)6-BA 与 2,4-D 浓度均为 0.050~0.075 mg/mL 的对比对萝卜愈伤组织诱导效果最好。

关键词:萝卜;激素;直根;愈伤组织;诱导率

中图分类号: Q943.1;S631.104⁺.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)07-0060-03

萝卜(*Raphanus sativus*)是中国主要的大众化蔬菜作物之一,在民间有“小人参”之美称,具有较高的食用价值和医用价值。萝卜采用常规育种手段需时长且劳动强度大,通过组织培养能够大量扩繁原种,并能更好地保持萝卜良种的性状。关于萝卜组织培养的研究,国内外都有大量报道^[1-9],但大多数研究中应用的激素种类比较单一,外植体的类型从萝卜的带柄子叶、子叶、下胚轴、花药等进行研究,但未涉及外植体萝卜根部对愈伤组织的影响。本试验旨在研究不同激素浓度配比下,以萝卜根部形成层为外植体进行愈伤组织的培养,分析不同激素配比对萝卜愈伤组织形成的影响及愈伤组织的生长情况,找出萝卜组织培养过程中适宜的激素配比浓度范围,为萝卜的组培技术提供理论参考。

收稿日期:2014-04-01

基金项目:发酵资源与应用四川高校重点实验室项目(编号:2012KFJ002);宜宾学院青年基金(编号:2012Q14)。

作者简介:胡伟(1981—),男,宁夏吴忠人,硕士,讲师,主要从事有机农业及作物生产系统模拟与决策研究。E-mail:wh_1981225@163.com

通信作者:陈豫,博士,副教授,主要从事农村沼气及生态农业研究。E-mail:chenyu@nwsuaf.edu.cn。

[35] Zhuang F L, Fuchs R T, Sun Z Y, et al. Structural bias in T4 RNA ligase-mediated 3'-adapter ligation[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(7): e54.

[36] Langmead B, Trapnell C, Pop M, et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome[J]. Genome Biology, 2009, 10(3): R25.

[37] Li R Q, Yu C, Li Y R, et al. SOAP2: an improved ultrafast tool for short read alignment[J]. Bioinformatics, 2009, 25(15): 1966-1967.

[38] Li Heng, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform[J]. Bioinformatics, 2009, 25(14): 1754-1760.

[39] Bagijn M P, Goldstein L D, Sapetschnig A, et al. Function, targets, and evolution of *Caenorhabditis elegans* piRNAs[J]. Science, 2012, 337(694): 574-578.

1 材料与方法

1.1 试验材料

选用生长健壮、体型匀称、表面无伤痕的市场销售的新鲜萝卜。试验所用的 3 种激素为分裂素 6-BA(6-苄氨基嘌呤)和生长素 2,4-D(2,4-二氯苯氧乙酸)、NAA(萘乙酸)。

1.2 试验方法

1.2.1 诱导培养基的配制 在 MS 培养基中添加 3% 蔗糖、0.8% 琼脂和不同激素浓度配比(表 1),作为本试验诱导愈伤组织的培养基。配制好培养基后,用 0.1 mol/L 的 NaOH 或 0.1 mol/L 的 HCl 溶液在灭菌前将培养基 pH 值调至 5.8~6.0,然后将培养基分装到 100 mL 的三角培养瓶中,用封口膜封好瓶口,在 121℃ 下湿热灭菌 30 min,灭菌后冷却待用。

1.2.2 愈伤组织的诱导 用自来水将萝卜直根表面污物冲洗干净,用小刀切成小段放入烧杯中。先用 75% 乙醇对萝卜小段消毒 5 min,用无菌吸水纸吸干,再用 0.2% 氯化汞溶液消毒 3 min,放入无菌水中漂洗 2~3 次,用无菌吸水纸吸干。在无菌操作台上操作,把消毒好的萝卜直根放入无菌培养皿中,用消毒好的解剖剪将萝卜的形成层切成 0.5 cm³ 左右的小块,置于含有不同激素浓度配比的愈伤组织诱导培养基上,25℃ 暗培养,无需光照。外植体培养每隔 3~5 d 观察 1 次,

[40] Vaucheret H. MicroRNA-dependent trans-acting siRNA production[J]. Science's STKE, 2005(30): pe43.

[41] Hammell M, Long D, Zhang L, et al. MirWIP: microRNA target prediction based on microRNA-containing ribonucleoprotein-enriched transcripts[J]. Nature Methods, 2008, 5(9): 813-819.

[42] Betel D, Koppal A, Agius P, et al. Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites[J]. Genome Biology, 2010, 11(8): R90.

[43] Bu D C, Yu K T, Sun S L, et al. Noncode v3.0: integrative annotation of long noncoding RNAs[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40: D210-D215.

[44] Deana A C, Belasco J G. The bacterial enzyme RppH triggers messenger RNA degradation by 5' pyrophosphate removal[J]. Nature, 2008, 451(7176): 355-358.