

陶波,刘洋,李向勇,等.大豆中不同除草剂作用靶标酶的 miRNA 前体克隆[J].江苏农业科学,2016,44(9):24-27.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.09.007

大豆中不同除草剂作用靶标酶的 miRNA 前体克隆

陶波¹,刘洋¹,李向勇¹,金龙国²,邱丽娟²

(1.东北农业大学农学院,黑龙江哈尔滨 150010;2.中国农业科学院作物科学研究所/

国家农作物基因资源与遗传改良重大科学工程/农业部作物种质资源与生物技术重点开放实验室,北京 100081)

摘要:对前人已预测的大豆 miRNA 的 4 个茎环结构进行引物设计、克隆 miRNA 前体,先将设计好的接头与大豆小 RNA 的 3'末端连接,然后利用与接头序列互补的引物对小 RNA 进行反转录,即可得到加接头的第 1 链 cDNA,再用基因特异引物 GSP 和通用接头引物的组合,经 PCR 扩增后即可捕获位于已知序列区和接头之间的 3'端 RNA 序列。结合 3'端引物的测序结果,初步预测成熟 miRNA 可能的 6 个组合是同一家族。

关键词:miRNA;EPSPS(5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸合成酶);基因序列;草甘膦;克隆

中图分类号:S482.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)09-0024-04

草甘膦是一类具有特异性,且能有效抑制叶绿体酶、5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸合成酶(EPSPS)的除草剂^[1-2]。对 EPSPS 作用的草甘膦能阻断莽草酸酯途径,通过竞争性抑制磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)与 EPSPS 结合,形成稳定的三元络合物,从而阻断 PEP 与 3-磷酸莽草酸(S3P)反应生成 EPSPS,最终阻止芳香族氨基酸的生物合成,抑制芳香族氨基酸的生成,导致植物死亡^[3-4]。

microRNA(miRNA)是指真核生物中长度约为 21~25 nt 的小型内源的非编码单链 RNA 家族。microRNA 是 Lee 等于 1993 年在线虫中首次发现的。此后,大量的 microRNA 在植物和动物中被发现和克隆^[5],到目前为止,植物中发现的 microRNA 分子已逾 200 种^[6]。microRNA 是近年来非编码 RNA 研究的热点。它们在组织发育和细胞分化的特定阶段表达,可以在转录后水平对许多基因的表达起着重要的调控作用

用^[7]。miRNA 通过 2 种途径发挥其作用:(1)miRNA 与靶 mRNA 序列不完全互补,它主要通过靶 mRNA 的不完全互补配对进而阻抑 mRNA 的翻译过程,这种途径对 mRNA 的稳定性无任何影响,属于翻译水平基因调节;(2)miRNA 与靶 mRNA 序列完全互补,它可以通过与小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)类似的途径与靶 mRNA 完全互补配对进而降解靶 mRNA,属于转录后水平基因调节^[8]。

在各类小分子 RNA 中,miRNA 具有最广泛的基因调节功能^[9],内含子 miRNA 具有反向调节其宿主基因的功能^[10-11],可能有以下几种情况:(1)当宿主基因是内含子 miRNA 的靶基因时,内含子 miRNA 直接下调宿主基因的表达,抑制其功能的发挥,这是直接作用。譬如,内含子 miR-204 被预测可直接靶向其宿主基因 *TRPM3*^[12]。(2)内含子 miRNA 还可以通过下调促进宿主基因功能的靶基因,从而拮抗宿主基因的功能。目前还未见有这方面的试验证据,但不能否定这种情况存在的可能性。文献报道内含子 miR-25 的可能靶基因是 *FHL2* 基因,而 *FHL2* 蛋白则通过与宿主基因编码的蛋白 MCM7 相互作用从而促进其功能^[13]。因此,我们推测内含子 miR-25 有可能有反向调节宿主基因 *FHL2* 的功能,当然这还有待今后进一步试验证实。拟南芥中的 miR160 通过负调控生长素响应因子(auxin response factors)ARF10 和 ARF16 的表达而控制根冠细胞的形成^[14]。玉米中的 *GL15*

收稿日期:2016-03-29

基金项目:国家转基因生物新品种培育重大专项(编号:2013ZX08004-001)。

作者简介:陶波(1963—),男,黑龙江哈尔滨人,博士,教授,博士生导师,研究方向为新型农药开发。E-mail:botaol@163.com。

通信作者:邱丽娟,博士,研究员,博士生导师,研究方向为大豆基因资源发掘。E-mail:qulijuan@caas.cn。

[21]钟卫鸿,曹剑峰,薛浚,等.氮和磷对铜山源水库优势藻生长的影响试验研究[J].环境污染与防,2003,25(1):20-22.

[22]Morel C, Tunney H, Plenet D, et al. Transfer of phosphorus ions between soil and solution: perspective in soil testing[J]. Journal of Environment Quality, 2000, 29(1): 50-59.

[23]Stephen A M, Johnna L K. Lake and reservoir management[J]. Water Environment Research, 1998, 70(4): 767-775.

[24]苑韶峰,吕军,俞劲炎.氮、磷的农业非点源污染防治方法[J].水土保持学报,2004,18(1):122-125.

[25]甘小泽.农业面源污染的立体化削减[J].农业环境与发展, 2005(5):34-37.

[26]Birgand F, Skaggs R W, Chescheir G M, et al. Nitrogen removal in

streams of agricultural catchments—a literature review[J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2007, 37(5): 381-487.

[27]Chen D, Lu J, Huang H, et al. Stream nitrogen sources apportionment and pollution control scheme development in an agricultural watershed in eastern China[J]. Environmental Management, 2013, 52(2): 450-466.

[28]Zhu G, Wang S, Wang W, et al. Hotspots of anaerobic ammonium oxidation at land-freshwater interfaces[J]. Nature Geoscience, 2013, 6(2): 103-107.

[29]高懋芳,邱建军,刘三超,等.基于文献计量的农业面源污染研究发展态势分析[J].中国农业科学,2014,47(6):1140-1150.

活性增高不仅使幼年期叶片增多,而且延缓生殖发育,而 miR172 对 GL15mRNA 水平进行负调控,从而促进玉米幼叶向成熟叶片转变^[15]。贾小云等发现,miR828 可以通过靶向 SIMy7-like 负调控花青素合成相关基因的表达,进而负调控番茄植株中花青素的生物合成^[2]。这些都表明植物中 miRNA 具有负反馈调节机制^[16]。

本研究对前人预测的除草剂作用靶标酶的大豆 miRNA 的 4 个茎环结构进行引物设计,克隆 miRNA 前体,从而进一步研究它们在植物生长发育中的生物学意义和分子水平上的调节机制,而且还可以有目的、有计划地利用它们进行植物生长发育的调控和生理结构的改造,使植物更大限度地表现出对人类研究有利的性状,从而为人类生产生活造福。

1 材料与与方法

1.1 供试材料

大豆基因组 EST 序列数据库来源: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; RNA-fold predict: <http://frontend.bioinfo.rpi.edu/zukerm/home.html>; Mipred confirm: <http://www.bioinf.seu.edu.cn>。

1.2 试验方法

利用生物信息学方法,对不同除草剂作用靶标酶 EST 序列进行 miRNA 预测。通过 RNA-fold predict 软件对原始 EST 序列预测,初步得到 12 个 microRNA 二级结构,利用 Mipred confirm (<http://www.bioinf.seu.edu.cn>) 进一步筛选,共筛选到 4 个 miRNA 前体,其中 2 个 EPSP 合成酶、1 个谷氨酰胺合成酶、1 个原卟啉原氧化酶。

本试验中,先将设计好的接头与大豆小 RNA 的 3' 末端连接,然后利用与接头序列互补的引物对小 RNA 进行反转录,即可得到加接头的第 1 链 cDNA;再用基因特异引物 GSP 和通用接头引物的组合,经 PCR 扩增即可捕获位于已知序列区和接头之间的 3' 端 RNA 序列。

1.2.1 连接 3' 接头 3' 接头序列: 5' - P04 - UUUCTAG-CACGAGCTCGCTACGCTCACTACTCGGCATTATGTACGCTAACTAACTCGTGGTC (idT) - 3'。首先将总 RNA 与 3' 接头均匀混合,80 °C 下处理 2 min 后置于冰中冷却。配制反应体系:无核酸酶的水 18.6 μL、10 × T4 RNA 连接酶缓冲液[不含牛血清白蛋白(BSA-free)] 4.0 μL、BSA (0.1%) 2.4 μL、3' 接头 2.0 μL、总 RNA 11 μL、T4 RNA 连接酶 (40 U/μL) 2.0 μL (100 μmol/L)、5 °C 反应 16 h 后,加入 2 μL 0.5 mol/L EDTA 终止反应;70 °C 下处理 10 min 以灭活连接酶,之后置于冰中保存。需要注意的是,配制反应体系时须按照以下顺序:无核酸酶的水 → 10 × T4 RNA 连接酶缓冲液 → 0.1% BSA → 总 RNA & 3' 接头混合液。

1.2.2 连接 5' 接头 5' 接头序列: 5' - GGAATTCGGATC - 3', 通过 TaKaRa 生产的末端转脱氧核苷酸转移酶作用,使 5' 接头 poly(G) 连接到 cDNAs 的 3' 末端,随后利用 BamH I (dC)₁₆ 引物进行 PCR 扩增,结果 5' 接头被克隆到质粒 pTZ18 上。

1.2.3 合成 cDNA cDNA 文库合成反应体系:10 × 逆转录酶缓冲液 8.0 μL、MgCl₂ (25 mmol/L) 16 μL、dNTP (10 mmol/L) 8.0 μL、AMV 逆转录酶 (20 U/μL) 4.0 μL、RNA-

sin (RNA 酶抑制剂, 40 U/μL) 2.0 μL、RT 引物 (100 μmol/L) 4.0 μL、连接有 3' 接头的总 RNA 38 μL。首先将反应液与 RT 引物均匀混合,80 °C 下处理 2 min 后置于冰中冷却。RT 引物序列: 5' - GACCACGAGTTAGTTCAGCGTACAT - 3'。然后参照配制反应体系 (Promega 公司试剂盒),按照以下程序合成 cDNA 文库: 30 °C 10 min → 42 ~ 55 °C 1 h → 95 °C 5 min → 5 °C 5 min。

1.2.4 PCR 检测反应体系和反应程序 递减 PCR (Touchdown PCR) 是在引物的最高退火温度与最适退火温度之间,以一定温度梯度逐步递减至最适退火温度,即通过在 PCR 的前几个循环使用严谨退火条件以提高扩增产物特异性的方法。例如循环可设在比估算的退火温度高约 5 °C 的退火温度下开始,然后每个循环降低 1 ~ 2 °C,直到降至退火温度 (也可低于退火温度 5 °C)。特异性最高的目的模板会被优先扩增,这些产物在随后的循环中继续扩增并占据优势。

1.2.5 割胶回收、转化连接、测序 DNA 纯化后利用琼脂糖凝胶 DNA 回收方法割胶回收。在微量离心管中配制下列 DNA 溶液 (全量为 5 μL): pMD19-T 载体 1 μL; Control Insert (TaKaRa 提供的 DNA 片段) 1 μL; ddH₂O 3 μL。加入 5 μL (等量) 的 Solution I, 16 °C 反应 30 min。全量 (10 μL) 加入至 100 μL JM109 感受态细胞中,冰中放置 30 min。42 °C 加热 45 s 后,再在冰中放置 1 min。加入 890 μL SOC 培养基,37 °C 振荡培养 60 min。在含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 L-琼脂平板培养基上培养,形成单菌落。计数白色、蓝色菌落;挑选白色菌落,使用 PCR 法确认载体中插入片段的大小;将培养液送出测序。

2 结果与分析

2.1 对已预测的 4 个 miRNA 前体序列进行引物设计

确定 3' 端对预测的茎环结构设计 3' 端引物。设计原则: 在 4 个茎环上游,根据碱基配对比例设计 1 条引物,分别前移 3 个碱基、后移 3 个碱基,设计 3 条引物 (表 1)。

表 1 对预测的大豆 miRNA 4 个茎环结构设计引物

除草剂作用靶标酶基因	设计引物序列 (5'→3') (24 bp)
<i>epsps-1</i>	GGGAAATTCGGCATGTTTAAAGGT
<i>epsps-1</i> 前移 3 个	GAAGGAAATTCGGCATGTTTAA
<i>epsps-1</i> 后移 3 个	AAATTCGGCATGTTTAAAGTTTC
<i>epep-2</i>	CTGTCCACCTGTTCGTGTAATGG
<i>epep-2</i> 前加 3 个	AAACTGTCCACCTGTTCGTGTAAT
<i>epep-2</i> 后移 3 个	TCCACCTGTTCGTGTAATGGGAA
谷氨酰胺合成酶	TTGTGCTGCTTGCATTTACACTT
谷氨酰胺合成酶前加 3 个	CATTGTGCTGCTTGCATTTACA
谷氨酰胺合成酶后移 3 个	TGCTGCTGCTTGCATTTACACTT
原卟啉原氧化酶	CGTGTGCACATTTTGGTTATCTT
原卟啉原氧化酶前加 3 个	CAGCGTGTGCACATTTTGGTTAT
原卟啉原氧化酶后移 3 个	GTTGCACATTTTGGTTATCTTTAG

由于 microRNA 本身序列较短,加接头的目的是与 microRNA 连接便于扩增与识别,3' 接头 (64 bp) 为: 5' - PUUU-CACTAGCAGAGCTCGCTACGCTCACTACTCGGCATTATGTAC-GCTAACTAACTCGTGGTCX - 3'。

2.2 小 RNA 的回收、转化连接、PCR 检测及测序

对设计的 12 条引物进行 PCR 扩增、回收、转化连接和

PCR 检测。图 1 显示,每个引物挑 5 个克隆,目标片段大小约 85 bp(3'接头 64 bp,小 RNA 20 bp 左右),每个引物选 1 管菌液送去测序。

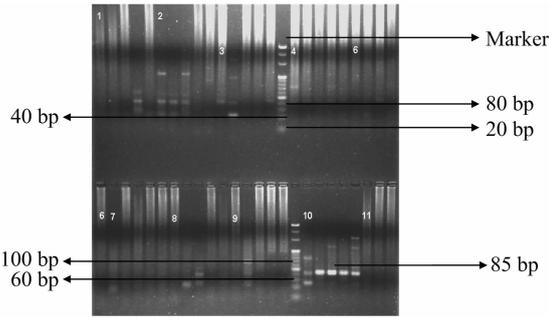


图 1 对除草剂作用靶标酶小 RNA 预测 12 个引物 PCR 检测结果

EPSP-2 引物序列:5' - CTGTCCACCTGTTCTGTAAATGG - 3';

3' - adaptor (64 bp):5' - p UUUCACTAGCAGCTCGC TACGCTCACTACTCGGCATTATGTACGCTAACTAACTCGTGGTCT X - 3'。

测序结果:

1 5' - GCGTAACTGGTCGGGGACTCTAGAGATTCTGTCCACCTGTTCTGTAAATGGTTTCACTA

61 GCACGAGCTCGCTACGCTCACTACTCGGCATTATGTA CGCTAACTAACTCGTGGTCAATC - 3'。

EPSP-2 前加 3 个碱基引物序列:5' - AACTGTCCACCTGTTCTGTAAA - 3'。

测序结果:

1 5' - CCGAATCGGTCGGGGACCTCTAGAGAT GACCA CGAGTTAGTTAGCGTACATAATGCCG

61 AGTAGTGAGCGTAGCGAGCTCGTGTAGTGAAA TTTACACGAACAGTGGACAGTTTAAAT - 3'。

测序结果表明,对预测的 4 个茎环结构,其中只有 EPSP-2 设计的 2 条引物与接头相连接,引物与接头完全接上,还不能确定是否是 miRNA,为进一步验证,须继续设计引物。

2.3 设计引物对 EPSP 合成酶-2 进一步验证

上述结果表明:由于在 EPSP-2 前加 3 个碱基引物序列为 5' - AACTGTCCACCTGTTCTGTAAA - 3' 共 24 bp,完全接到接头上,不能确定 3' mapping,故再向后、向前推 2 个碱基,设计 1 条 22 bp 引物:5' - ACTGTCCACCTGTTCTGTAAA - 3' 和 1 条引物:5' - AACTGTCCACCTGTTCTGTGA - 3'。

表 2 设计引物确定 3' mapping

除草剂作用靶标酶基因	设计引物序列(5'→3')(22 bp)
<i>epsp-2-1</i>	ACTGTCCACCTGTTCTGTAAA
<i>epsp-2-2</i>	AAACTGTCCACCTGTTCTGTGA

EPSP-2-1 引物序列:5' - ACTGTCCACCTGTTCTGTGA - AA - 3';

3' - adaptor (64 bp):5' - PUUCACTAGCAGCTCGC TACGCTCACTACTCGGCATTATGTACGCTAACTAACTCGTGGTCT X - 3'。

已经预测的小 RNA 前体序列:

5' - AGAUGUUGAUUGCUUUCUUGGCACA AACUGUCCA CCUGUUCGUGUAAA UGG GAAGGGAGGACUCCUGGCGG AAAGGUGAAACUGUCUGGAUCAGUUAGCAGUCAAUACCU - 3'。

测序结果:

961 5' - CTTGCATGCCTGCAGGTGACGATTACTGTCCA CCTGTTCGTGTA AAA TGG TTCTACTAGC

1021 ACCGAGCTCGCTACGCTCACTACTCGGCATTATGT ACGCTAACTAACTCGTGGTCAATCTC - 3'。

EPSP-2-2 引物序列:5' - AACTGTCCACCTGTTCTGTGA - 3'。

已经预测的小 RNA 前体序列:

5' - AGAUGUUGAUUGCUUUCUUGGCACA AACUGUCCA CCUGUUCGUGU AAAUGGGAAGGGAGGACUCCUGGCGGAAAGGUGAAACUGUCUGGAUCA GUUAGCAGUCAAUACCU - 3'。

测序结果:

5' - CCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAAT TGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGTATGACCATGATTAC GCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTGACGATTAACTGTCCACCTGTTCCG TGTAAATTTCACTAGCAGGCTCGTACGCTCACTACTCGGCATTATG TACGCTAACTAACTCGTGGTCAACTCTAGAAGTCCCGACATCGTAATA AACAAAAAACC - 3'。

测序结果表明:引物 EPSP-2-1 在 3'端扩出 TGG,而引物 EPSP-2-2 在 3'端扩出 AA,而且碱基 TGG 和 AA 均存在于已经预测的小 RNA 前体序列中,如果这种 3'端多态性确实存在,那么这个茎环结构上的 miRNA 初步认为是家族式的。

为了进一步验证这种多态性的可靠性,在 2 个 cDNA 文库中去扩增:“B Lib.”文库(含豆粒)和“R Lib.”(不含豆粒)文库(图 2),每个平板挑 10 个克隆,进行测序。

测序结果表明:在上述 2 个文库中,每个文库挑 10 个克隆,可以看出 3'端序列存在多态性,且重复性较高,3'端端点有 4 种可能(表 3)。

测序结果表明:在上述 2 引物中,每个引物挑 5 个克隆,可以看出 5'端序列存在多态性,5'端序列有 5 种可能,详见表 4。

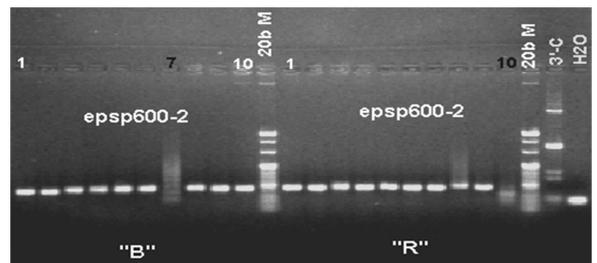


图 2 2 个文库对 EPSP-2-2 引物的 PCR 检测结果

表 3 对 3'端的测序结果

引物序列(5'→3')	3'端结果	出现频率
AAACTGTCCACCTGTTCTGTGA	AA	7/20
AAACTGTCCACCTGTTCTGTGA	AATGA	3/20
AAACTGTCCACCTGTTCTGTGA	AATGG	5/20
AAACTGTCCACCTGTTCTGTGA	AATGGGAA	1/20

结合 3'端的测序结果(表 3),初步预测的成熟 miRNA 可能的 6 个组合,可能是同一家族。预测序列如下:

表4 对5'端的测序结果

引物序列(5'→3')	5'端结果	出现频率
TTTACACGAACAGGTGGACAGT	引物本身	3/5
TTTACACGAACAGGTGGACAGT	GAT	1/5
CCATTACACGAACAGGTGGAC	G	2/5
CCATTACACGAACAGGTGGAC	T	1/5
CCATTACACGAACAGGTGGAC	GCCG	2/5

- (1) 5' - TGTCACCTGTTCTGTGTA AAA - 3' (20 bp);
 (2) 5' - ATCACTGTCCACCTGTTCTGTGTA AAA - 3' (25 bp);
 (3) 5' - CGTCCACCTGTTCTGTGTA AAAATGG - 3' (23 bp);
 (4) 5' - AGTCCACCTGTTCTGTGTA AAAATGG - 3' (23 bp);
 (5) 5' - CGGCGTCCACCTGTTCTGTGTA AAAATGG - 3' (26 bp);
 (6) 5' - AGTCCACCTGTTCTGTGTA AAAATGGGAA - 3' (26 bp)。

后续的试验将主要依赖核酸杂交技术。利用试验认定是同一家族的可能6个microRNA组合基因序列作为探针进行Northern Blotting,可以在RACE的基础上进一步验证microRNA是否表达。

3 讨论

本试验从4个靶标酶入手,首先通过软件预测miRNA的二级结构,可知miRNA的二级结构是茎环结构。根据已知miRNA的二级结构碱基配对比例,通过筛选,挑选出可能的miRNA前体,miRNA前体在形成成熟miRNA的过程中,茎环结构中的一条茎被降解,另一条茎形成成熟的miRNA^[17]。尽管从理论上来说,成熟的miRNA产生是随机选择的结果,但由于2条链的稳定性有所不同,导致机会的不等^[18]。而本研究只是对4个茎环中其中1条茎设计引物,没有对另外的茎设计引物,所以不能排除其他3个茎环结构中也含有成熟的miRNA。本研究确定6个miRNA组合,可能是同一家族。植物miRNA具有簇集现象,多数miRNA不是分散分布的,而是2个或多个基因由1个前体miRNA加工而来,成簇排列的基因协同表达,显现出在基因表达方面的数量优势^[19]。

后续试验将主要依赖核酸杂交技术^[20]。利用试验认定为同一家族可能的6个microRNA组合基因序列作为探针进行Northern Blotting,可以在RACE的基础上进一步验证microRNA的表达与否。由于microRNA基因的表达比蛋白基因更迅速,且不受翻译过程影响,对目标基因表达的调控效率更高,我们可以把它作为一种强有力的工具,借助它来完成突变体的构建与特定基因表达的调控。虽然对植物microRNA的研究取得了很大进展,但是植物miRNA在转录和转录后水平上其本身如何被调控及其被调控后的结果是怎样的,这些问题都需要人们去研究和探索^[21]。随着植物microRNA越来越多地被发现,可以继续研究它们在植物生长发育中的生物学意义和在分子水平上的调节机制,而且还可以有目的、有计划地对它们进行植物生长发育的调控和生理结构的改造,使植物更大幅度地表现出对我们有利的性状,从而为人类的生产生活造福。

参考文献:

[1] 代俊萍,蔡民华,张飞雄. 植物miRNA研究进展[J]. 首都师范大

学学报,2004,25(增刊1):44-46.

- [2] 贾小云,刘慧,沈洁,等. MicroRNA828负调控缺磷胁迫诱导的番茄花青素生物合成[J]. 中国农业科学,2015,48(15):2911-2924.
- [3] 金龙国,王川,刘进元. 植物MicroRNA[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2006,22(8):609-614.
- [4] 卢加举,廖文彬,朱白婢,等. MicroRNA的研究进展[J]. 分子植物育种,2006,6(4):73-77.
- [5] 吴丹,胡兰. MicroRNA及其研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2006,33(1):40-42.
- [6] Barrel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell,2004,116(2):281-297.
- [7] Bartel B, Bartel D P. MicroRNAs: at the root of plant development[J]. Plant Physiology,2003,132(2):709-717.
- [8] Chen C Z. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors[J]. The New England Journal of Medicine,2005,353(17):1768-1771.
- [9] Deo M, Yu J Y, Chung K H. Detection of mammalian microRNA expression by in situ hybridization with RNA oligonucleotides[J]. Developmental Dynamics,2006,235(9):2538-2548.
- [10] Herrmann K M, Weaver L M. The shikimate pathway[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,1999,50(4):47-50.
- [11] Gruys K J, Marzabadi M R, Pansegrau P D, et al. Steady-state kinetic evaluation of the reverse reaction for *Escherichia coli* 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics,1993,304(2):345-351.
- [12] Gruys K J, Walker M C, Sikorski J A. Substrate synergism and the steady-state kinetic reaction mechanism for EPSP synthase from *Escherichia coli*[J]. Biochemistry,1992,31(24):5534-5544.
- [13] Lauter N, Kampani A, Carlson S, et al. MicroRNA172 down-regulates glossy15 to promote vegetative phase change in maize[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2005,102(26):9412-9417.
- [14] Li S C, Tang P, Lin W C. Intronic microRNA: discovery and biological implications[J]. DNA and Cell Biology,2007,26(4):195-207.
- [15] Petrocca F, Visone R, Onelli M R, et al. E2F1-regulated microRNAs impair TGF β -dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer[J]. Cancer Cell,2008,13(3):272-286.
- [16] Schmid J, Amrhein N. Molecular organization of the shikimate pathway in higher plants[J]. Phytochemistry,1995,39(4):737-749.
- [17] Du T, Zamore P D. Microprimer: the biogenesis and function of microRNA[J]. Development,2005,132(21):4645-4652.
- [18] Wang J W, Wang L J, Mao Y B, et al. Control of root cap formation by microRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell,2005,17(8):2204-2216.
- [19] Xie Z X, Kasschau K D, Carrington J C. Negative feedback regulation of Dicer-Like1 in *Arabidopsis* by microRNA-guided mRNA degradation[J]. Current Biology,2003,13(9):784-789.
- [20] 肇莹,肖军,杨镇,等. 转导芦苇总DNA耐盐变异水稻SSH文库的构建及部分基因特异表达[J]. 江苏农业科学,2015,43(3):13-16.
- [21] Xie Z, Allen E, Fahlgren N, et al. Expression of *Arabidopsis* miRNA gene[J]. Plant Physiology,2005,138(4):2145-2154.