

张雪如,王稳利,邱宗波,等. 高山松 miR171a 及其靶基因的鉴定与表达分析[J]. 江苏农业科学,2021,49(7):62-66.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.07.010

高山松 miR171a 及其靶基因的鉴定与表达分析

张雪如^{1,2}, 王稳利^{1,2}, 邱宗波^{1,2}, 曾倩倩^{1,2}

(1. 河南师范大学生命科学学院,河南新乡 453007; 2. 河南省农业微生物生态与技术国际联合实验室/河南师范大学,河南新乡 453007)

摘要:以裸子植物高山松为试验材料,利用笔者所在实验室前期构建的高山松 miRNA 数据,通过生物信息学方法筛选与高山松生长发育相关的 miR171a,并通过基于 RNA 连接酶的 cDNA 末端快速扩增法(RLM-5'RACE)验证得出,GRAS 家族转录因子(Unigene10015)和肌动蛋白结合蛋白(Unigene83401)的基因为高山松 miR171a 的靶基因。通过 PCR 技术克隆得到的高山松 miR171a 前体序列可形成茎环发夹结构,但其成熟序列的碱基保守性较差。系统进化分析显示,pde-miR171a 与裸子植物火炬松的进化关系较近。经 qRT-PCR 分析发现,pde-miR171a 在高山松茎中的相对表达量最高,其次是在针叶中,而靶基因 Unigene10015 在茎、针叶中的相对表达量较低,暗示 pde-miR171a 可以通过调控靶基因 Unigene10015 而参与高山松的生长发育。

关键词:高山松;miR171;靶基因;荧光定量 PCR

中图分类号: S718.46 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)07-0062-05

microRNA(miRNA)是一类由 21~24 个核苷酸组成的内源性单链小 RNA,主要是在转录后水平介导靶 mRNA 的降解或翻译抑制来调控基因表达^[1]。自研究者从秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)中发现第 1 个 miRNA 以来,miRNA 一直是研究的热点^[2]。近年来,越来越多的研究发现,miRNAs 在高山松(*Pinus densata*)的生长发育^[3]、杉木种子的萌发^[4]及落叶松体胚的生长发育和形态建成等方面起着重要的调控作用^[5]。

miR171 是在植物中最早发现的 miRNAs 家族成员之一^[6],在拟南芥中有 3 个 miRNA 成员,分别是 ath-miR171a、ath-miR171b 和 ath-miR171c^[7]。通过基于 RNA 连接酶的 cDNA 末端快速扩增(RNA ligase-mediated 5' rapid amplification of cDNA ends,简称 RLM-5'RACE)试验,研究者发现水稻中的 miR171 能介导靶基因 *OsHAM*(GRAS 家族转录因子)mRNA 的剪切降解,从而促进水稻营养生长向生殖生长的过渡及根尖分生组织稳态的形成^[8]。杨树 miR171 通过调控 GRAS 转录因子而参与杨树的生长发育和光形态建成的调控^[9]。张力等研究发现,烟草 miR171c 通过负调控 SCL 靶基因 *TC134811*、*TC127385*,使植物出现顶端优势丧失和茎秆增多等表型^[10]。尽管目前关于 miR171 在多个植物中功能的研究较多,但目前在裸子植物高山松中,miR171 的鉴定及其在高山松生长发育过程

收稿日期:2020-08-05

基金项目:国家自然科学基金(编号:31500499);河南省高校科技创新人才项目(编号:16HASTIT019)。

作者简介:张雪如(1996—),女,河南洛阳人,硕士研究生,主要从事植物发育生物学方面的研究。E-mail:1365655297@qq.com。

通信作者:邱宗波,博士,教授,主要从事植物分子生物学方面的研究。E-mail:qjzongbo@126.com。

[14] 郑国琴,柳金凤. 宁夏枸杞叶片组培快繁技术研究[J]. 北方园艺,2012(1):122-124.

[15] 代其林. 水杨酸对低温下水稻幼苗生理生化特性的影响[D]. 成都:四川大学,2004.

[16] 吴倩. CAT 调控水稻叶片光呼吸过程中抗氧化系统的机理研究[D]. 扬州:扬州大学,2013.

[17] Sun H P, Li F, Ruan Q M, et al. Identification and validation of reference genes for quantitative real-time PCR studies in *Hedera helix* L. [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 108: 286-294.

[18] 缪珊,夏振平,李志强. NaCl 胁迫对 3 种狼尾草生长及生理

特性的影响[J]. 黑龙江农业科学,2019(6):132-136.

[19] 沈金玲,钟镇芬,黄永健,等. 盐胁迫对桉树(*Eucalyptus*)活性氧代谢和 CAT 基因表达的影响[J]. 分子植物育种,2020,18(5):1661-1665.

[20] Zhang Y Y, Liu J H. Transgenic alfalfa plants co-expressing glutathione S-transferase (GST) and human CYP2E1 show enhanced resistance to mixed contaminants of heavy metals and organic pollutants [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 189(1):357-362.

[21] 刘明坤. 西伯利亚蓼 GST 和 CS 基因双价载体构建及转酵母和烟草研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2009.

中的功能尚不清楚。

高山松是一种具有重要生态意义的裸子植物^[11]。本研究根据高山松小 RNA 高通量测序结果获得的 miR171a, 进行前体序列的克隆与分析。通过在线预测网站获得 miR171a 的靶基因, 并通过 RLM-5'RACE 进行验证。同时还分析了 miR171a 及其靶基因在高山松不同组织部位的表达特性, 为揭示 miR171a 在高山松生长发育中的作用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2 月龄的高山松幼苗于 2019 年 5 月置于温室中培养(昼一夜生长温度周期为 25 ℃—18 ℃, 光—暗周期为 16 h—8 h, 相对湿度为 65% ~ 70%)。

1.2 高山松 miR171 前体序列的克隆及其二级结构预测

使用植物 Concert Plant RNA Reagent (美国 Invitrogen 公司) 从 2 月龄的高山松幼苗中提取总 RNA。从笔者所在实验室得到的高山松 miRNA 高通量测序数据中获得高山松 miR171a 的前体序列: 5'-AAAGAAUGUGAUGUUGGCUAGGCUCAAUCG GAUUGUAACGCCACGGAAUUUGGUCUUGUGAU

CUGAUUGAGCCGUGCCAAUAUCACAUUCUAAC-3', 用 Primer 5.0 软件设计特异性引物进行 PCR 扩增(表 1)。采用 Clustalx 2.0 软件, 以高粱 *sbi*-miR171a、拟南芥 *ath*-miR171a、油菜 *bn*a-miR171a、玉米 *zma*-miR171a、大豆 *gma*-miR171a、火炬松 *pta*-miR171a、毛白杨 *ppt*-miR171a、水稻 *osa*-miR171a、毛果杨 *ptc*-miR171a 及卷柏 *smo*-miR171a 的成熟序列为模板进行序列比对。用 MEGA 7.0 构建 miR171a 前体序列的系统进化树, 通过 RNAfold web server 在线软件预测 miR171a 前体序列的二级结构。

1.3 高山松 miR171a 靶基因的预测与切割位点的验证

将高山松 miR171a 的成熟序列提交到靶基因在线预测网站 psRNATarget (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>) 上, 以高山松的转录组数据库作为靶标, 设置期望值为 2.5, 其余参数为默认值。将预测到的靶基因比对到 GO (gene ontology) 数据库中, 确定其功能。依据靶基因的 cDNA 序列, 用 Primer 5.0 软件设计用于 RLM-5'RACE 的引物(表 1)。RLM-5'RACE 试验参照孔雷等的方法^[12], 扩增出的特异产物后进行克隆测序。

表 1 RT-PCR、RT-qPCR 和 RLM-5'RACE 的引物

用途	引物	序列(5'→3')
RT-PCR	<i>pde</i> -miR171 F	GCAGATGCTACAGTGTGTAAACG
	<i>pde</i> -miR171 R	AATGGAATGGAATGGAGTGGATGA
RT-qPCR	<i>pde</i> -miR171 F	TGTTGGCTAGGCTCAATCGG
	<i>pde</i> -miR171 R	TGTGATATTTGGCAGCGCTCA
	<i>Unigene10015</i> F	AATAATGGTGAAGCCAGACT
	<i>Unigene10015</i> R	CTGTTGTAAGTGGCTACTTGG
RLM-5'RACE	<i>pde</i> - <i>actin</i> F	AGAAATCCAGCCCCTTGTA
	<i>pde</i> - <i>actin</i> R	CCCCATACCAACCATCACA
	<i>Unigene10015</i> -outer	TCCAGCGGTGAAGAGATATTTGAA
	<i>Unigene10015</i> -inner	GCGGTGAAGAGATATTTGAAGTTG
	<i>Unigene45569</i> -outer	TTGAATCTTTGAGCAACACGCACA
	<i>Unigene45569</i> -inner	CTTTGAGCAACACGCACAATGACT

1.4 实时荧光定量 PCR

使用植物 Concert Plant RNA Reagent (美国 Invitrogen 公司) 分别提取 2 月龄高山松幼苗根、茎和针叶的总 RNA。用 Superscript II reverse transcriptase (美国 Invitrogen 公司) 进行反转录。荧光定量试验使用 Thunderbird SYBR Green PCR

Master Mix 试剂盒(日本 Toyobo 公司)。以 *actin* 作为 miR171a 和靶基因 *Unigene10015* 的内参基因。利用 Rotor-Gene 3000 型实时 PCR 扩增仪检测, 每个样品设 3 次生物学重复。基因相对表达量的测定采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法 (C 表示循环数; T 表示荧光阈值)^[13], 将基因在根中的表达水平设成 1。

2 结果与分析

2.1 pde-miR171a 前体序列的扩增及二级结构的预测

从笔者所在实验室前期得到的高山松 miRNA 高通量测序数据中筛选得到高山松 miR171a 的前体序列,进行引物设计,以高山松基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,得到高山松 miR171a 的前体序列长度为 96 bp(图 1)。用 RNAfold 软件在线分析其二级结构,发现高山松 pre-miR171a 可折叠成典型的茎环发夹结构(图 2),预测得出其二级结构的最小折叠自由能(minimal folding free energy, 简称 MFE)为 -230.74 kJ/mol, 最小折叠自由能指数

(minimal folding free energy index, MFEI) 为 1.28, miR171a 的成熟序列(5'-UGAUUGAGCCGUGCCA AUAUC-3')位于茎环结构的 3'端。

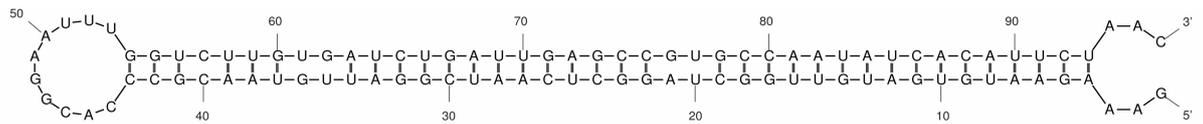


图2 pde-miR171a 前体的茎环结构

2.2 高山松 miR171a 成熟序列和前体序列的分析

对 miRBase 数据库中不同植物的 miR171a 成熟序列与高山松 miR171a(pde-miR171a)的成熟序列进行比对,发现除了高粱 sbi-miR171a、pde-miR171a 的成熟序列完全一致外,其他物种的 miR171a 如拟南芥 ath-miR171a、玉米 zma-miR171a、火炬松 pta-miR171a、水稻 osa-miR171a、油菜 bna-miR171a、大豆 gma-miR171a、毛白杨 ppt-miR171a、毛果杨 ptc-miR171a 及卷柏 smo-miR171a 与高山松 pde-miR171a 的成熟序列间有 1 个或多个碱基的差异(图 3),表明高山松 pde-miR171a 的成熟序列在不同物种中的保守性不高。用 MEGA 7.0 对毛白杨、玉米、卷柏、高粱、拟南芥、火炬松、大豆、水稻、油菜和高山松的 MIR171a 共 25 个成员构建系统发育树。结果(图 4)显示,不同物种的 MIR171 前体保守性不高,高山松与火炬松的前体序列聚为一类,二者间的进化关系较近。

2.3 高山松 miR171a 靶基因的预测及 RLM-5' RACE 验证

以高山松 miR171 成熟序列为对象、高山松转录组数据库为靶标,用 psRNAtarget 进行 pde-miR171a 靶基因预测。如表 2 所示,pde-miR171a 的靶基因分别为 GRAS 家族转录因子(*Unigene10015*)、肌动蛋白结合蛋白(*Unigene83401*)及未知蛋白(*Unigene84522*),其中 pde-miR171a 与高山松 GRAS 家族转录因子

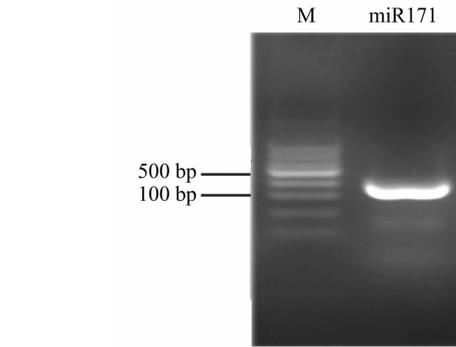


图1 高山松 miR171a 前体序列的扩增结果

拟南芥 ath-miR171a	TGATTGAGCCGCGCCAATATC...	21
油菜 bna-miR171a	...TTGAGCCGTGCCAATATCACG	21
大豆 gma-miR171a	...TGAGCCGTGCCAATATCACG	20
水稻 osa-miR171a	TGATTGAGCCGCGCCAATATC...	21
高山松 pde-miR171a	TGATTGAGCCGTGCCAATATC...	21
毛白杨 ppt-miR171a	...TGAGCCGCGCCAATATCAC	20
火炬松 pta-miR171a	TGATTGAGACGAGTCCATATC...	21
毛果杨 ptc-miR171a	...TTGAGCCGTGCCAATATCACG	21
高粱 sbi-miR171a	TGATTGAGCCGTGCCAATATC...	21
卷柏 smo-miR171a	...TTGAGCCGTGCCAATATCACT	21
玉米 zma-miR171a	TGATTGAGCCGCGCCAATAT...	20
consensus	**** * * * * *	

图3 不同植物 miR171a 成熟序列比对

(*Unigene10015*)的匹配程度最高。

为了进一步验证高山松 miR171a 对潜在靶基因是否存在剪切作用,笔者用 RLM-5'RACE 方法对靶基因 *Unigene10015*、*Unigene83401* mRNA 的 3'端剪切产物进行扩增。测序结果表明,高山松 pde-miR171a 对 GRAS 家族转录因子的剪切位点位于第 13 个至第 14 个碱基之间,对肌动蛋白结合蛋白的剪切位点位于经典切割位点下游第 20 个碱基处(图 5),表明 GRAS 家族转录因子(*Unigene10015*)和肌动蛋白结合蛋白(*Unigene83401*)的基因确实是 miR171a 的靶基因,miR171a 可以在转录后水平调控 GRAS 家族转录因子和肌动蛋白结合蛋白基因的表达。

2.4 高山松 pde-miR171a 及其靶基因 *Unigene10015* 在不同组织中的表达分析

通过荧光定量 PCR 检测 pde-miR171a 及其靶基因 *Unigene10015* 在高山松根、茎和针叶中的表达

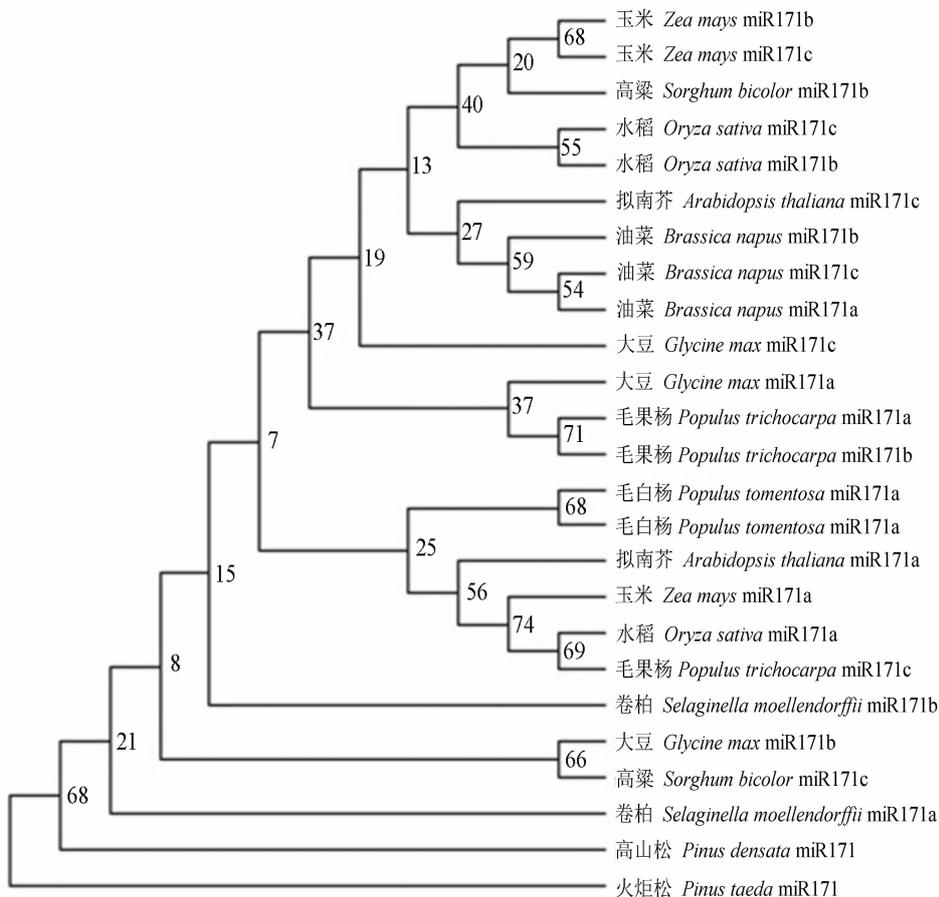
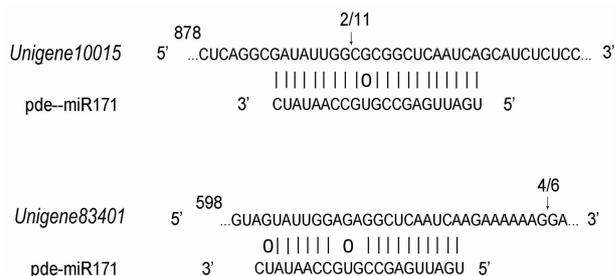


图4 高山松与其他植物种 miR171 前体序列的系统进化树分析

表 2 高山松 miR171a 靶基因及功能预测结果

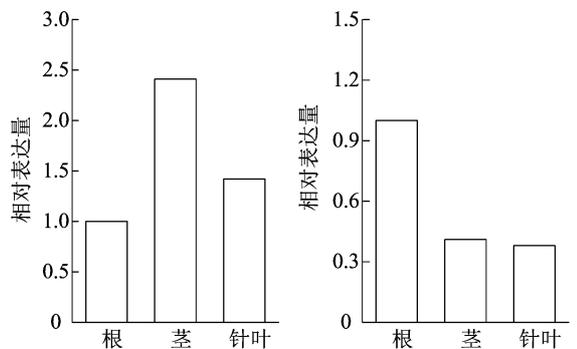
靶基因	得分	靶蛋白	GO 注释
<i>Unigene10015</i>	0.5	GRAS 家族转录因子	DNA binding
<i>Unigene84522</i>	0.5	未知蛋白	
<i>Unigene83401</i>	3.0	肌动蛋白结合蛋白	<i>actin binding</i>



箭头表示 miR171a 对靶基因的剪切位点

图5 高山松 miR171a 靶基因切割位点的验证

情况。结果(图6)显示, pde - miR171a、*Unigene10015* 在高山松不同组织中的表达情况存在差异, pde - miR171a 在茎中的相对表达量最高, 其次在针叶中, 而靶基因 *Unigene10015* 在茎、针叶中的相对表达量最低; 靶基因 *Unigene10015* 的相对表达量与 pde - miR171a 的相对表达量呈负相关。



a. miR171a 在根、茎和针叶中的相对表达量
b. *Unigene10015* 在根、茎和针叶中的相对表达量
图6 pde-miR171a 和靶基因 *Unigene10015* 在高山松根、茎和针叶中的相对表达量

3 讨论与结论

随着高通量测序技术的快速发展,对裸子植物进行高通量转录组测序的研究不断增多,有助于通过生物信息学方法对 miRNAs 的鉴定提供数据基础^[14-16]。本研究对鉴定到的 miR171a 前体基因 Pre - miR171a 进行克隆,得到 miR171a 的前体序列长度为 96 bp,可形成稳定的茎环发夹结构,说明 miR171a 确实在高山松中存在并表达。最小折叠自

由能指数 (minimal folding free energy index, 简称 MFEI) 是将 miRNA 与其他小分子 RNA 区分开来的重要参数, 一般植物的 MFEI 大于 0.85^[17]。在本研究中, miR71a 前体的 MFEI 为 1.28, 显著高于黑胡椒 miR171 前体的 MFEI (0.80)^[6], 但与拟南芥^[18]、水稻^[8] 和烟草^[10] 中 miRNA 前体的 MFEI 类似。这些结果为进一步研究高山松 miR171a 的功能奠定了基础。

植物的成熟 miRNA 能通过核酸互补指导 RNA 诱导的沉默复合体 (RISC) 去切割或者抑制靶基因表达^[19]。目前主要采用 5'RACE (rapid amplification of cDNA ends) 的方法验证 miRNA 对靶基因 mRNA 的切割作用^[12]。笔者用 RLM-5'RACE 方法对预测的 2 个靶基因 *Unigene10015* (GRAS 家族转录因子)、*Unigene83401* (肌动蛋白结合蛋白) 进行验证。结果显示, 高山松 miR171a 介导靶基因 *Unigene10015* (GRAS 家族转录因子) 的 mRNA 剪切降解, 且剪切位点在第 13、第 14 位碱基之间。通过 5'RACE 试验方法发现, 拟南芥中 GRAS 家族转录因子 Scarecrow-Like 是 miR171 的靶基因, 切割位点也在第 13、第 14 位碱基之间^[7]。另外, 高山松 miR171a 与靶基因 *Unigene83401* (肌动蛋白结合蛋白) 的切割位点在典型的 miRNA 切割位点下游第 20 个碱基处, 这可能是由于 siRNA 在 miRNA 切割位点下游第 20 个核苷酸处发生的第 2 次切割^[20]。以上结果表明, miR71a 能够通过识别、结合, 然后切割相应的靶基因, 从而调控高山松的生长发育。

参考文献:

- [1] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [2] Zhang B H, Pan X P, Cobb G P, et al. Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact [J]. *Developmental Biology*, 2006, 289(1): 3-16.
- [3] Wan L C, Zhang H Y, Lu S F, et al. Transcriptome-wide identification and characterization of miRNAs from *Pinus densata* [J]. *BMC Genomics*, 2012, 13: 132-142.
- [4] Cao D C, Xu H M, Zhao Y Y, et al. Transcriptome and degradome sequencing reveals dormancy mechanisms of *Cunninghamia lanceolata* seeds [J]. *Plant Physiology*, 2016, 172(4): 2347-2362.
- [5] Li W F, Zhang S G, Han S Y, et al. The post-transcriptional regulation of LaSCL6, by miR171 during maintenance of embryogenic potential in *Larix kaempferi* (Lamb.) Carr. [J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2014, 10(1): 223-229.
- [6] Asha S, Nisha J, Soniya E V. *In silico* characterisation and phylogenetic analysis of two evolutionarily conserved miRNAs (miR166 and miR171) from black pepper (*Piper nigrum* L.) [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2013, 31: 707-718.
- [7] Llave C, Xie Z X, Kasschau K D, et al. Cleavage of scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA [J]. *Science*, 2002, 297(5589): 2053-2056.
- [8] Fan T, Li X M, Yang W, et al. Rice osa-miR171c mediates phase change from vegetative to reproductive development and shoot apical meristem maintenance by repressing four *OsHAM* transcription factors [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0125833.
- [9] 刘志祥, 曾超珍, 曾渭贤, 等. 杨树 MIR171 基因家族进化与功能分化研究 [J]. *植物遗传资源学报*, 2014, 15(2): 313-319.
- [10] 张力, 沙爱华. 烟草 microRNA171c 的功能分析 [J]. *植物科学学报*, 2016, 34(5): 775-780.
- [11] Wang B S, Mao J F, Gao J, et al. Colonization of the Tibetan plateau by the homoploid hybrid pine *Pinus densata* [J]. *Molecular Ecology*, 2011, 20(18): 3796-3811.
- [12] 孔雷, 朱向向, 王屹玮, 等. 茶树 miR164a 及其靶基因的鉴定与表达分析 [J]. *茶叶科学*, 2018, 38(6): 547-558.
- [13] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_t} method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [14] Qiu Z B, Wan L C, Chen T, et al. The regulation of cambial activity in Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) involves extensive transcriptome remodelling [J]. *New Phytologist*, 2013, 199(3): 708-719.
- [15] Wang L, Zhao J, Luo K, et al. Deep sequencing discovery and profiling of conserved and novel miRNAs in the ovule of *Ginkgo biloba* [J]. *Trees*, 2016, 30(5): 1557-1567.
- [16] Wen C H, Lin S S, Chu F H. Transcriptome analysis of a subtropical deciduous tree: autumn leaf senescence gene expression profile of *Formosan gum* [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2015, 56(1): 163-174.
- [17] Zhang B H, Pan X P, Cox S B, et al. Evidence that miRNAs are different from other RNAs [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2006, 63(2): 246-254.
- [18] Wang L, Mai Y X, Zhang Y C, et al. 2010. MicroRNA171c-targeted *SCL6-II*, *SCL6-III* and *SCL6-IV* genes regulate shoot branching in *Arabidopsis* [J]. *Molecular Plant*, 3(5): 794-806.
- [19] Carthew R W, Sontheimer E J. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs [J]. *Cell*, 2009, 136(4): 642-655.
- [20] Ronemus M, Vaughn M W, Martienssen R A. MicroRNA-targeted and small interfering RNA-mediated mRNA degradation is regulated by argonaute, dicer, and RNA-dependent RNA polymerase in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(7): 1559-1574.