

大豆 *gma-miR1508a* 靶基因鉴定及植物表达载体构建

倪志勇,于月华,任燕萍,陈全家,曲延英

(新疆农业大学 农学院/新疆农业大学农业生物技术重点实验室,新疆 乌鲁木齐 830052)

摘要:MicroRNAs 是内源的非编码小 RNA 分子,在植物生长、发育和逆境响应过程中具有重要的调控功能。本研究采用 5' RLM-RACE 方法鉴定了大豆 *gma-miR1508a* 的 1 个靶基因 *Glyma16g27800*。为了构建 *gma-miR1508a* 的过表达载体,使用烟草花叶病毒组成型启动子 35S 控制 *gma-miR1508a* 的过表达,采用 PCR 方法从大豆基因组 DNA 中扩增了 101 bp 含有折回结构的前体序列,扩增片段被亚克隆至 pCambia3301 载体中,PCR 和测序结果表明 *gma-miR1508a* 植物表达载体构建成功。

关键词:大豆;*gma-miR1508a*;靶基因;植物表达载体

中图分类号:Q78 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2015.06.1090

Validation of Selected *gma-miR1508a* Targets and Construction of Its Plant Expression Vectors

NI Zhi-yong, YU Yue-hua, REN Yan-ping, CHEN Quan-jia, QU Yan-ying

(College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University/ Key Laboratory of Agricultural Biological Technology, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) are endogenous, noncoding, small RNAs that have essential regulatory functions in plant growth, development, and stress response processes. In this study, one target gene of *gma-miR1508a*, *Glyma16g27800*, was verified using a modified 5' RLM-RACE (RNA ligase mediated rapid amplification of 5' cDNA ends) assay. To generate an overexpression construct that constitutively overexpressed *gma-miR1508a* under the control of a cauliflower mosaic virus 35S promoter, a 101 bp fragment flanking the miRNA sequence including the fold-back structure was amplified from soybean genomic DNA by PCR. The amplified fragment was subcloned into the pCambia3301 vector. PCR and sequencing results suggest that plant expression vector of *gma-miR1508a* gene was constructed successfully. This constructed vectors provided an effective tool for the further study of *gma-miR1508a* gene function.

Keywords: Soybean; *gma-miR1508a*; Target gene; Plant expression vector

MicroRNA (miRNA) 是真核生物中一类长度为 20~24 个核苷酸的小 RNA 分子,是真核基因表达的关键的转录后调控子^[1-2]。miRNA 通过切割靶基因 mRNA 或抑制靶基因翻译 2 种方式下调靶基因的表达。miRNA 在植物的多种发育进程,信号转导,应答非生物胁迫和生物胁迫中具有重要的功能^[3-6]。

植物中大多数 miRNA 在物种间是保守性的,而不同的物种中也存在一些特异的非保守的 miRNA,这些非保守的 miRNA 可能与特定物种的形成和特有的发育过程有关。*miR1508* 是大豆中特有的非保守的 miRNA,可能在大豆对非生物胁迫的应答中具有功能。例如,陈锐^[7]通过 Northern 杂交实验发现野生大豆 *miR1508a* 在根、茎和叶中都有表达,在叶片中表达略高,且受干旱胁迫诱导上调表达。罗中钦^[8]通过芯片筛选发现大豆 *miR1508a* 受干旱和低温胁迫诱导上调表达。鉴定 *gma-miR1508a* 的靶基因有助于进一步揭示 *gma-miR1508a* 在非生物胁迫应答中的功能。生物信息学方法是常用的鉴定 miRNA 靶基因的一种方法,例如李永光等^[9]发现在

大豆幼苗中 *gma-miR1508a* 受低温诱导上调表达,采用生物信息学方法发现 *gma-miR1508a* 的启动子中存在 2 个低温应答元件 LTR,并通过 PMRD 网站预测了 7 个 *gma-miR1508a* 的靶基因,并通过分析拟南芥同源基因表达发现其中 5 个候选的靶基因与低温应答相关。最近,降解组测序法被广泛使用在全基因组水平鉴定植物 miRNA 的靶基因^[10-11],例如胡正等^[12]通过降解组测序证明 4 个基因 *Glyma12g13590.2*, *Glyma16g25410.1*, *Glyma16g27640.1* 和 *Glyma16g28020.1* 是 *gma-miR1508a* 的靶基因。

然而,通过生物信息学方法预测的 *gma-miR1508a* 的靶基因,需要进一步的生物学试验验证。目前鉴定 miRNA 靶基因的最可靠方法是 5'-RLM-RACE (RNA ligase mediated rapid amplification of 5' cDNA ends) 方法,该方法能够鉴定 miRNA 的精确切割位点^[13]。本研究采用 5'-RLM-RACE 鉴定 *gma-miR1508a* 对它的靶基因 *Glyma16g27800* 切割的精确位点,并构建了 *gma-miR1508a* 的植物表达载体,为进一步通过转基因方法研究 *gma-miR1508a* 的功能提供实验基础。

收稿日期:2014-12-30
基金项目:中国博士后科学基金(2015M582741);国家自然科学基金(31360264);新疆维吾尔自治区高校科研计划科学研究重点项目(XJEDU2014I015);新疆维吾尔自治区自然科学基金(2014211A025,2013211B19);新疆农业大学草业科学国家级重点学科。
第一作者简介:倪志勇(1981-),男,博士,副教授,主要从事植物逆境分子生物学研究。E-mail:nizhiyong@126.com。

1 材料与方法

1.1 植物材料

大豆(*Glycine max* L. Merr.)栽培品种 Williams 82 由中国农业科学院作物科学研究所作物种质资源中心抗逆研究课题组提供。在温室中,水培25 d 后取叶片和根组织,液氮速冻,保存于-80℃冰箱。

1.2 大豆叶片基因组 DNA 的提取

采用 CTAB 方法^[14] 提取大豆叶片基因组 DNA。

1.3 5'-RLM-RACE

按照 TRNzol(Invitrogen 公司)的操作步骤提取正常生长 25 d 大豆根的 RNA,使用 GeneRacer 试剂盒(Invitrogen)对总 RNA 进行加工来确定最初转录本的 5'末端。总 RNA 被直接连接上 RNA 接头,使用试剂盒中提供的 oligo(dT)引物,在 SuperScript III 反转录酶的作用下进行反转录反应。按照巢式 PCR 的操作步骤扩增 cDNA 模板。第一轮 PCR 使用 GeneRacer5'-引物和特异基因引物(16g27800-R: 5'-GCAACTTGACGGCGCATCTCGTTTCTCC-3')扩增,巢式 PCR 使用第一轮 PCR 产物 1 μL 作为模板,用 GeneRacer 5'-巢式引物和特异基因的内部引物(16g27800-NR: 5'-GGCCATTTGGCCCAAGTGGCAG-AAACAATTG-3')扩增,扩增完成后,凝胶纯化 5' RACE 产物并亚克隆至 pGM-T 载体(promega),经 PCR 检测,选取 7 个单克隆测序,确定精确切割位点。

1.4 植物表达载体构建

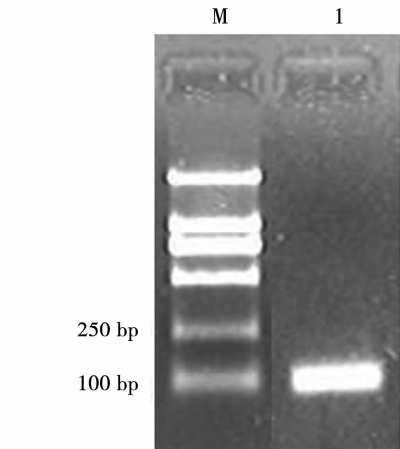
根据 *gma-miR1508a* 的 101 bp 的前体序列设计引物,引物序列如下:nTMIR1508a-F:5'-TTTCCATGGTT-GAATTGCTATCCAAGTCTA-3' 和 nTMIR1508a-R: 5'-TTTAGATCTTT GAAGCACCCTCAACTGCT-3' (下划线表示酶切位点),在引物的前向引入 *Nco* I 酶切位点,反向 *Bgl* II 酶切位点。以大豆叶片基因组 DNA 为模板,使用全式金公司的 *TransStart™ Taq* DNA Polymerase 进行 PCR 扩增,按说明书中推荐的 PCR 体系和反应程序进行扩增。将纯化后的 PCR 产物和 pCAMBIA3301 载体质粒,用 *Nco* I 和 *Bgl* II 进行双酶切,使用凝胶回收试剂盒回收酶切产物,在 T4 DNA 连接酶的作用下将 *gma-miR1508a* 的 101 bp 的前体序列亚克隆到 pCAMBIA3301 载体,将重组质粒送北京鼎国昌盛生物技术有限公司测序鉴定,获得 *gma-miR1508a* 的植物表达载体。

2 结果与分析

2.1 5'-RLM-RACE 鉴定大豆 *gma-miR1508a* 的靶基因

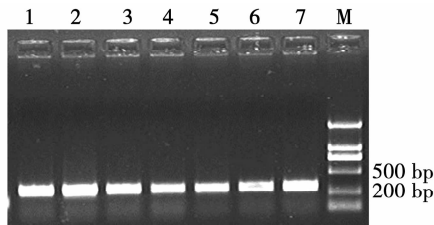
为了鉴定 *Glyma16g27800* 的转录本在体内是否受到大豆 *gma-miR1508a* 的调控,本研究采用 5'-

RLM-RACE 的方法在大豆根 RNA 中鉴定 *Glyma16g27800* 的切割产物,通过 2 轮 PCR 反应,获得了一条切割产物条带,大小为 107 bp(图 1),将该 PCR 产物连接到 pGM-T 载体,采用通用的载体引物对菌液进行扩增,发现 *Glyma16g27800* mRNA 裂解长度一致(图 2),随机选取 7 个阳性菌液进行测序发现, *Glyma16g27800* mRNA 的切割位点在 *gma-miR1508a* 互补的第 12 和 13 位核苷酸之间(图 3)。



M:DL2000 marker; 1: 5' RACE 产物。
M:DL2000 marker; 1: 5' RACE product.

图 1 *Glyma16g27800* 转录本 5' RACE 扩增产物
Fig. 1 The amplified product of the 5' RACE on the *Glyma16g27800* transcript



M:DL2000 marker; 1~7: PCR 产物。
M:DL2000 marker; 1-7:PCR product.

图 2 *Glyma16g27800* mRNA 裂解长度分布
Fig. 2 Distribution of truncated mRNAs of *Glyma16g27800*

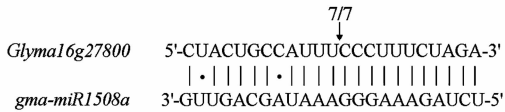
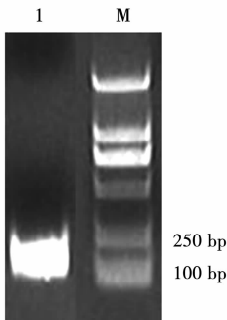


图 3 通过 5' RACE 鉴定 *Glyma16g27800* 的 5'末端
Fig. 3 The 5'end of the *Glyma16g27800* determined by 5' RACE

2.2 大豆 *gma-miR1508a* 植物表达载体构建

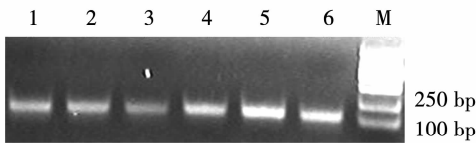
采用 PCR 方法从大豆叶片基因组 DNA 中扩增 *gma-miR1508a* 的前体序列,获得了大小为 101 bp 的片段(图 4),将该片段亚克隆到 pCAMBIA3301 中,经菌液 PCR 检测,重组菌中能够扩增出 101 bp 的 *gma-miR1508a* 前体序列(图 5),测序结果表明该序列与 *gma-miR1508a* 前体序列一致,获得了 *gma-*

miR1508a 前体序列的植物表达载体。



M;DL2000 marker; 1: PCR 产物。
M;DL2000 marker; 1:PCR product.

图4 大豆 *gma-miR1508a* 前体序列的扩增
Fig.4 Amplification of the *gma-miR1508a* precursor sequence



M;DL2000 marker; 1~6:*gma-miR1508a*-pCambia3301 重组质粒 PCR 产物。
M;DL2000 marker; 1-6:PCR product of *gma-miR1508a*-pCambia3301 recombinant plasmid.

图5 *gma-miR1508a*-pCambia3301 重组质粒菌液 PCR 鉴定

Fig.5 PCR identification of *gma-miR1508a*-pCambia3301 recombinant plasmid

3 讨论

植物的 miRNA 与其靶 mRNA 之间的互补性比较高,有利于通过生物信息学方法预测 miRNA 的靶基因。然而生物信息学预测的 miRNA 靶基因需要通过生物学实验来进行验证,目前验证 miRNA 的体系有农杆菌注射法^[15]、体外检测 miRNA 切割活性^[13]和 5'-RLM-RACE。其中,5'-RLM-RACE 是目前鉴定 miRNA 靶 mRNA 的最可靠方法,本研究通过 5'-RLM-RACE 鉴定了大豆 *gma-miR1508a* 的一个靶基因 *Glyma16g27800* 的精确切割位点。切割位点位于 *gma-miR1508a* 互补的第 12 和 13 位核苷酸之间,这与之前报道的靶 mRNA 的切割位点多位于互补 miRNA 第 10 和 11 为核苷酸处不同,有一些研究也有类似的报道,造成这种现象的原因可能与 DCL 酶切割不准确有关^[16]。本研究构建了大豆 *gma-miR1508a* 的植物表达载体,下一步将通过转化大豆来验证 *gma-miR1508a* 的生物学功能。

参考文献

[1] Jones-Rhoades M W, Bartel D P, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2006,57:19-53.

[2] Chuck G, Candela H, Hake S. Big impacts by small RNAs in plant development[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2009, 12 (1): 81-86.

[3] Liu Q, Chen Y Q. Insights into the mechanism of plant development: Interactions of miRNAs pathway with phytohormone response[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009,384 (1):1-5.

[4] Chen J, Li W X, Xie D, et al. Viral virulence protein suppresses RNA silencing-mediated defense but upregulates the role of microRNA in host gene expression[J]. The Plant Cell, 2004,16 (5): 1302-1313.

[5] Sunkar R, Kapoor A, Zhu J K. Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by down regulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance[J]. The Plant Cell, 2006,18 (8):2051-2065.

[6] Ni Z Y, Hu Z, Jiang Q Y, et al. Overexpression of *gma-MIR394a* confers tolerance to drought in transgenic *Arabidopsis thaliana*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012, 427(2), 330-335.

[7] 陈锐. 耐旱野生大豆 MicroRNA 的鉴定与表达分析[D]. 北京:中国农业科学院,2009:86-87. (Chen R. Identification and expression analysis of microRNAs in drought-resistant wild soybean (*Glycine soja*) [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2009:86-87.)

[8] 罗中钦. 大豆逆境胁迫相关 microRNA 的发掘与验证[D]. 北京:中国农业科学院,2012:28-29. (Luo Z Q. Identification and validation of soybean microRNAs involved in stress responses [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2012: 28-29.)

[9] 李永光,艾佳,王涛,等. 大豆 *gma-miR1508a* 靶基因预测及功能分析[J]. 大豆科学,2014,33(4):479-482. (Li Y G, Ai J, Wang T, et al. The target genes prediction and analysis of *gma-miR1508a*[J]. Soybean Science, 2014, 33(4): 479-482.)

[10] 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.

[11] German M A, Luo S, 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.

[12] Hu Z, Jiang Q Y, Ni Z Y, et al. Analyses of a *Glycine max* degradome library identify microRNA targets and microRNAs that trigger secondary siRNA biogenesis[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2013, 55 (2): 160-176.

[13] Llave C, Xie Z, Kasschau K D, et al. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA[J]. Science, 2002, 297: 2053-2056.

[14] Ni Z Y, Hu Z, Jiang Q Y, et al. *GmNFYA3*, a target gene of *miR169*, is a positive regulator of plant tolerance to drought stress [J]. Plant Molecular Biology, 2013, 82, (1-2):113-129.

[15] Mallory A C, Bartel D P, Bartel B. MicroRNA-directed regulation of *Arabidopsis* AUXIN RESPONSE FACTOR 17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes[J]. The Plant Cell, 2005, 17 (5): 1360-1375.

[16] Zhao T, Li G L, Mi S J, et al. A complex system of small RNAs in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Genes & Development, 2007, 21:1190-1203.