

大豆 *gma-miR1510a* 生物信息学分析及人工 microRNA 植物表达载体构建

倪志勇,于月华,陈全家,曲延英

(新疆农业大学 农学院,新疆 乌鲁木齐 830052)

摘 要:MicroRNAs (miRNAs)是最近发现的一类广泛存在的内生的小 RNAs,在转录水平负调控基因的表达。本研究采用生物信息学方法分析 *gma-miR1510a* 的靶基因和启动子中的顺式作用元件。PLACE 和 PlantCARE 启动子数据库分析表明 *gma-miR1510a* 启动子具有一些参与非生物胁迫、植物激素、组织特异表达和光应答元件。PMRD 软件预测获得 9 个 *gma-miR1510a* 靶基因,属于抗病蛋白和 ATP 结合家族成员。通过重叠 PCR 方法替换拟南芥 *At-MIR319* 的成熟链和互补链序列,构建含有 *amiR1510a* 前体的植物表达载体 *amiR1510a*-pCAMBIA3301。

关键词:大豆;*gma-miR1510a*;amiRNA;启动子

中图分类号:Q78 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2016.02.0239

Bioinformatic Analysis of *gma-miR1510a* and Construction of Its Artificial MiRNA Plant Expression Vectors

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

(College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) are newly discovered extensive endogenous small RNAs, which negatively regulate gene expression at the post-transcription levels. In this study, the target gene and the promoter of *gma-miR1510a* gene were predicted and analyzed by bioinformatics methodology. Many response elements for abiotic stress, plant hormones, tissue-specific expression and light were predicted by the database search programs PLACE and PlantCARE. PMRD software analysis showed that 9 transcripts were targeted by *gma-miR1510a*, these targets belonged to disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) and ATP binding. The *amiR1510a* sequence was engineered into the miRNA and miRNA* of *At-MIR319* using overlapping PCR and the *amiR1510a* backbone was transferred into the plant expression vector pCAMBIA3301.

Keywords: Soybean; *gma-miR1510a*; amiRNA; Promoter

干旱和盐碱胁迫严重影响大豆的品质和产量。提高大豆的抗旱、耐盐能力是分子育种的主要目标之一。通过转基因方法提高大豆的抗逆性是一种有效的育种手段,因此挖掘应答干旱和盐碱胁迫的基因和其他调控因子,为转基因育种提供候选的优异基因资源尤为重要。MicroRNAs(miRNAs)是新近发现的一类广泛存在的内生的小 RNAs,在转录水平负调控基因的表达^[1-2]。许多研究表明 miRNAs 参与应答多种逆境胁迫^[3-8],对这些逆境胁迫应答 miRNAs 的研究成为逆境分子生物学研究的热点。

人工 microRNA (artificial microRNA, amiRNA) 技术是一种在植物中诱导基因功能丧失的新方

法^[9-12]。该技术利用 miRNA 基因骨架产生大小通常为 21 个核苷酸的人工小 RNAs, amiRNAs 参与 RNA 沉默途径,指导沉默感兴趣的目标基因^[13]。前人研究表明利用 amiRNAs 介导的基因沉默技术能够提高作物的农艺学性状、营养价值和抗逆性。例如,在水稻中通过 amiRNA 技术已经成功沉默 *pds* (phytoene desaturase)、*Spl11* (spotted leaf 11) 和 *Eui1* (elongated uppermost internode 1/CYP714D) 等内源基因^[14]。在水稻中减少 *Eui1* 基因表达能够提高稻粒品质,而且 amiRNAs 介导的基因沉默是高度特异性的,能够在后代中稳定遗传^[15]。在马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 中通过 amiRNA 技术沉默核心帽子

结合蛋白 CBP80,能够提高转基因株系的干旱忍耐能力^[16]。目前,关于大豆抗逆相关 miRNAs 人工 miRNA 表达载体的报道不多,本课题前期通过小 RNA 测序分析发现大豆 *gma-miR1510a* 受盐胁迫诱导表达。本研究利用生物信息学方法分析大豆特异的 miRNA *gma-miR1510a* 的前体序列、预测其启动子中存在的顺式作用元件和靶基因并构建了人工 miRNA 植物表达载体,为深入研究 *gma-miR1510a* 的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 *gma-miR1510a* 前体及启动子序列分析

检索植物 miRNA 数据库 PMRD^[17] (plant microRNA database, <http://bioinformatics.cau.edu.cn/PMRD/>) 获得 *gma-miR1510a* 的前体序列及上游 3 000 bp 的序列。利用 TSSP (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=tssp&group=programs&subgroup=promoter>) 预测 *gma-miR1510a* 启动子的转录起始位点。利用 PlantCARE 网站^[18] (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>) 和 PLACE^[19] (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) 分析启动子中的顺式作用元件。

1.2 *gma-miR1510a* 的靶基因预测

利用在线网站 psRNATarget^[20] (<http://plantgn.noble.org/psRNATarge>) 预测 *gma-miR1510a* 的靶基因,选取大豆基因组数据库 (Glycine_max_Williams_82 8x Release v1.01, cDNA, released 10/08/2008) 进行靶基因筛选,选取罚分 2 以下的基因作为 *gma-*

miR1510a 可能的靶基因。通过比对拟南芥中的同源基因对靶基因进行功能注释。

1.3 植物表达载体构建

根据大豆 *gma-miR1510a* 的成熟 miRNA 序列,利用 WMD3 网站中在线 Oligo 程序 (<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi?page=Oligo;project=stdwmd>) 设计置换 PCR 引物,用来扩增 *gma-miR1510a* 的 miRNA 和 miRNA* 序列。在拟南芥 *At-miR319* 前体扩增引物 319-3301-F/R 两端分别加入 *Nco* I 和 *Bgl* II 限制性内切酶位点,以便亚克隆至植物表达载体 pCAMBIA3301 中,引物序列见表 1。

以 *At-miR319*-pGM-T 质粒为模板,使用 LA-Taq 聚合酶,用 319-3301-F 和 *gma-miR1510a*-IV miR*a, *gma-miR1510a*-III miR*s 和 *gma-miR1510a*-II miR-a, *gma-miR1510a*-I miR-s 和 319-3301-R 3 组引物分别扩增 a,b,c 片段,凝胶回收 3 条条带,以 3 条条带的混合物为模板,使用 LA-Taq 聚合酶,用 319-3301-F/R 引物扩增置换后的 amiRNA 的前体片段,PCR 扩增体系和程序参考 Schwab 等^[10]的方法。凝胶回收 amiRNA 前体片段,通过 TA 克隆,连接至 pJET1.2 载体中,经菌液 PCR 和测序验证 amiRNA 前体序列的正确性。

用限制性内切酶 *Nco* I 和 *Bgl* II 双酶切 a-miR1510a-pJET1.2,将凝胶回收的 *amiR1510a* 片段连接到以相同酶切的 pCAMBIA3301 载体中,经菌液 PCR 和测序检测 *amiR1510a*-pCAMBIA3301 植物表达载体的正确性。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物 Primer	引物序列 Primer sequences
<i>gma-miR1510a</i> -I miR-s	5'-GATTGTTGTTTTACCTATTCCACCCTCTCTCTTTTGTATTCC-3'
<i>gma-miR1510a</i> -II miR-a	5'-GAGGGTGGGAATAGGTAAACAACAATCAAAGAGAATCAATGA-3'
<i>gma-miR1510a</i> -III miR*s	5'-GAGGATGGAATAGGTAAACAACAATCACAGGTCGTGATG-3'
<i>gma-miR1510a</i> -IV miR*a	5'-GATTGTTGTTTAACTATTCCATCCTCTACATATATATTCCT-3'
319-3301-F	5'-TAACCATGGCAAACACACGCTCGGACGCATATT-3'
319-3301-R	5'-TTTAGATCTCATGGCGATGCCTTAAATAAAGATAAACCC-3'

2 结果与分析

2.1 大豆 *gma-miR1510a* 的序列分析

gma-miR1510a 的前体序列长度为 93 bp,定位于大豆 16 号染色体 31518908-31519000 [+]。*gma-miR1510a* 的成熟序列长度为 23 bp,图 1 为 *gma-miR1510a* 前体茎环结构,方框表示成熟序列。序列比对发现大豆和野生大豆 *gma-miR1510* 家族的成员的前体一致性较高,达到 92. 82%,成熟的 23 bp 的 miRNA 序列相差 1 个碱基(图 2)。

2.2 大豆 *gma-miR1510a* 启动子中顺式作用元件分析

采用 TSSP 在线预测 *gma-miR1510a* 上游3 000 bp 序列的转录起始位点,发现其转录起始位点位于前体序列上游1 629 bp 处。利用 PlantCARE 和 PLACE 网站分析转录起始位点上游1 371 bp 的序列中的顺式作用元件,结果发现 *gma-miR1510a* 启动子中含有基本启动子元件 TATA-box 和 CAAT-box,激素应答元件包括生长素应答元件 TGA-element 和水杨酸应答元件 TCA-element,胚乳表达必须的顺式调控元件 Skn-1_motif,部分光响应元件 GATA-motif 和 Box I,与非生物胁迫应答相关元件包括冷和脱水应答调控元件 DRE,热激应答元件 HSE,参与干旱诱导的 MYB 结合元件 MBS(图 3)。

2.3 大豆 *gma-miR1510a* 的靶基因预测及分析

利用 psRNATarget 预测 *gma-miR1510a* 的靶基因,获得 9 个罚分 2 分以下的靶基因(表 2),发现 *gma-miR1510a* 的靶基因与拟南芥抗病蛋白和跨膜受体编码基因同源,暗示 *gma-miR1510a* 可能参与调控植物对病原菌的抵抗。

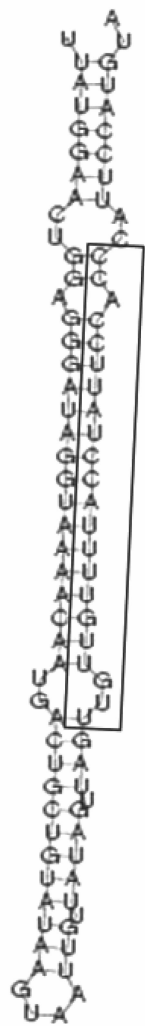


图 1 *gma-miR1510a* 前体茎环结构
Fig. 1 The miRNA precursor of *gma-miR1510a* stem-loop structure

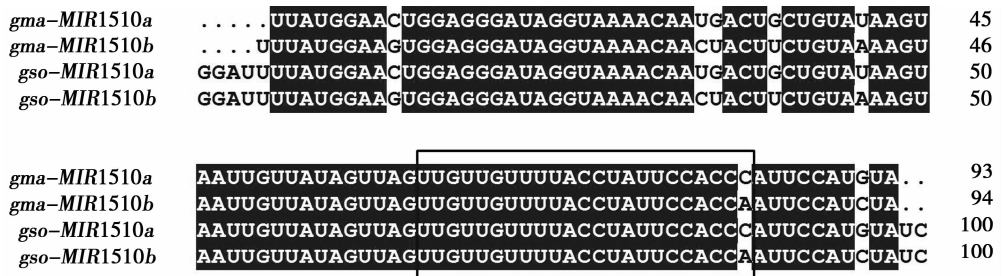


图 2 大豆 *miR1510* 基因家族前体序列比对
Fig. 2 Multiple sequence alignment of precursor sequence of *miR1510* gene family in soybean

ACTTGTTTTATTATACCTGACTTTTGTAGTCAATCGTTCAGCAATAGGTATATTAAACTTGGAACGCTACA
TGGACAATCATTTTACTGTTTTGTTTATCCTAATAAAAAAAATTGTACTTTTCATCAATGACATGTAGG
AAAGCAGACAGGCGAGTCCTGACAAGAATCAAATACTGTACATGGAGGAGTT**GTCGTT**AGTTTTAA
TGA-element
ATCAAGTTGAATCCATTCAAGACATTCTTCCTATAATTTCT**GTCATT**CTTGAGGTAAATCTAAGCATT
Skn-1_motif
GCATTTTATTTAAGAAATGTGGCTGTTTACCCATTTTTTCATTAACCTGTATA**AGTCATAAGTCATAAG**
Skn-1_motif Skn-1_motif
CAATTTTGCTTCTAGATATTCTTAACTCTATATAAACTGCTGAAGCATATGACTATCTATGTAATGGCA
GCTCCCACCAGAATCCCAGCAGCAATTGCTTCAATTGCC**CAGTTA**ACTTGGTTAGAAAAGTTAATATCT
MBS
CGTGCTGCTGCAAGAACTGTAAGGAGGGCCTTTTTATAACATGGATGAAGTAGCTGAAGCTGAAAT
CTTTTGTACTTCTCAACAAG**TGACCG**GAGAACATTGAAAAATAAATAAGGCTTTATGACAAGGCCT
MBS
TTAATCCTTAATGCTTCAATACACTGTTGATTCAACAACAT**TATTCTTCGC**TTTCAATTTCAATTTTTTTT
TCA-element
ATT**AATTTTATCT**TCGTTGTAAGTATTTATAGGTTTGCTTT**TTTCAAAT**TGGTTGTAAGGTAGTTAGGACT
GATA-motif Box I
ATAGAAAACATAAGTTTAATATAAGAATTCATATTTTGTTCCAAATAGTAATTAAAATTTCTCAAGGACT
AATTTGCTCTATTTTTAGAAGTTTCAGTGCAAGCAA**ACCGAC**GAAAAGGGGGCAATTTTTTT**TTCAA**
DRE Box I
AATTATTAATAAGAGTAAATTTAAATTAATATTCAAAAAGGAATAAATTATAGGTTATGCTACGACTT
GTGAATTGAATTGAAGGTAGTAAAGTATGTTACAATTTTCTTTTCTATTTTCACTGAAGTAGTAACT
ATTTTCTGATTTTTTTTCAATATACTTTAAAGTTGTAAGG**AATTTTTTTTCC**ATTAA**AGTCAT**AAATAT
HSE Skn-1_motif
TTTACGATTTTTTTTCCAACACAACTTAAATCGTAAAGAAGTATTTTTTTTTTCTTTTCCAACAAA
GTCGTAAAAAACTCAACTTCAATTTTTAATTTTTTTTA**AGTCATA**AATATTTATGCCTTCAAAATTATTT
Skn-1_motif
TATACACATATTAAATAAAATTTAAATTTATTTACTAAATAAATAAATAAATTTTTTT**CAAT**TTTAAA
TATA-box CAAT-box
AA**ATTTGAAA**ATAAAATAAAAAGATTACCATAAAAAAT**TATA**ACTTTTATTAAAAAAAT
Box I TATA-box

图 3 *gma-miR1510a* 启动子序列

Fig. 3 The promoter sequence of *gma-miR1510a*

表 2 *gma-miR1510a* 靶基因预测

Table 2 Target genes prediction of *gma-miR1510a*

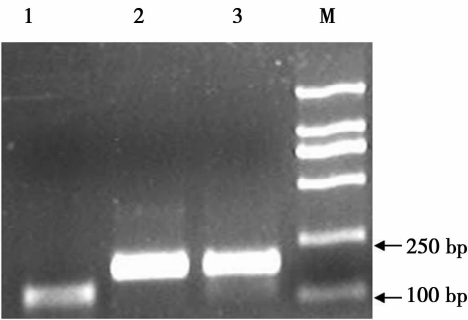
靶位点 Targets	罚分 Expection	同源基因 Homologous genes	靶位点类型 Target description
Glyma04g39740	2.0	AT5G36930	抗病蛋白 (TIR-NBS-LRR class)
Glyma06g36310	1.0	AT5G40910	抗病蛋白 (TIR-NBS-LRR class)
Glyma16g24940	2.0	AT5G36930	抗病蛋白 (TIR-NBS-LRR class)
Glyma16g25140	2.0	AT5G17680	抗病蛋白 (TIR-NBS-LRR class)
Glyma16g26270	2.0	AT5G17680	抗病蛋白 (TIR-NBS-LRR class)
Glyma16g27540	2.0	AT5G17680	抗病蛋白 (TIR-NBS-LRR class)
Glyma18g14660	1.5	AT5G17680	抗病蛋白 (TIR-NBS-LRR class)
Glyma19g07660	2.0	AT1G56540	抗病蛋白 (TIR-NBS-LRR class)
Glyma19g07680	2.0	AT1G72840	ATP 结合/ 蛋白结合 / 跨膜受体

2.4 植物表达载体 amiR1510a-pCAMBIA3301 的构建

通过置换 PCR 方法获得包含 *gma-miR1510a* 的大小分别为 118, 176 和 178 bp 3 个片段 a、b 和 c (图 4)。将 3 个片段混合作为模板,PCR 扩增获得 422 bp 的 *amiR1510a* 前体序列(图 5),将*amiR1510a*

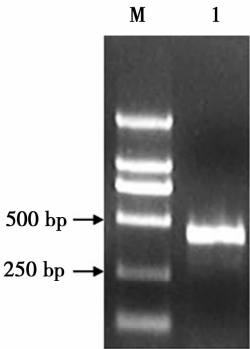
前体序列连接至 pJET1.2 载体中,PCR 结果表明从重组菌液中扩增出大小一致的条带(图 4),经测序比对表明 *amiR1510a* 碱基没有发生突变。将 *a-miR1510a* 前体序列酶切后连接至植物表达载体 pCAMBIA3301 载体中,PCR 结果表明扩增出 422 bp 的 *amiR1510a* 片段(图 5),测序结果表明 *a-*

miR1510a 序列碱基没有发生突变, *amiR1510a*-pCAMBIA3301 的构建完成。

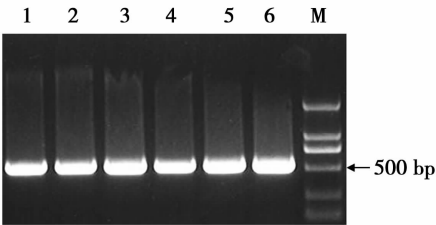


M:DL2000 marker; 1: a 片段 PCR 产物;2: b 片段 PCR 产物;3: c 片段 PCR 产物。
M: DL2000 marker; 1: PCR product of a fragment; 2: PCR product of b fragment; 3: PCR product of c fragment.

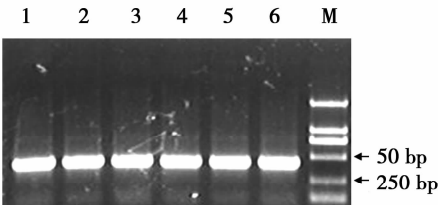
图 4 重叠 PCR 扩增产物
Fig. 4 Over-lapping PCR product



M:DL2000 marker; 1: PCR 产物。
M: DL2000 marker; 1:PCR product.
图 5 大豆 *gma-miR1510a* 前体序列的扩增
Fig. 5 Amplification of the *gma-miR1510a* precursor sequence



M:DL2000 marker; 1~6:amiR1510a-pJET1.2 重组质粒 PCR 产物。
M: DL2000 marker; 1-6: PCR product of amiR1510a-pJET1.2 recombinant plasmid.
图 6 PCR 检测 *amiR1510a*-pJET1.2 重组质粒
Fig. 6 PCR detection recombinant plasmid of *amiR1510a*-pJET1.2



M: DL2000 marker; 1 ~ 6: *amiR1510a*-pCAMBIA3301 重组质粒 PCR 产物。
M: DL2000 marker; 1-6: PCR product of *amiR1510a*-pCAMBIA3301 recombinant plasmid.

图 7 PCR 检测 *amiR1510a*-pCAMBIA3301 重组质粒
Fig. 7 PCR detection recombinant plasmid of *amiR1510a*-pCAMBIA3301

3 讨论

植物 amiRNA 技术利用 miRNAs 和其靶 mRNA 之间的高度互补性来确保 amiRNAs 沉默的特异性。相比 RNA 干扰 (RNAi) 和病毒诱导的基因沉默 (VIGS),植物 amiRNAs 有许多优点,例如极小的脱靶效果和多基因沉默的能力^[10,21]。本研究构建了 *gma-miR1510a* 的 amiRNA 表达载体,为转化大豆鉴定 *gma-miR1510a* 的生物学功能奠定基础。

本研究对 *gma-miR1510a* 的1 371 bp 启动子分析发现存在非生物胁迫、植物激素和光应答元件,其中 MBS 元件在拟南芥中是一个参与干旱忍耐的 MYB 结合位点^[22],DRE 元件是一个 DREB 转录因子特异结合元件,是植物应答逆境胁迫中非依赖 ABA 信号途径的一个主要元件^[23],暗示 *gma-miR1510a* 可能参与对干旱等非生物胁迫的应答。类似的,李永光等^[24]通过预测发现 *gma-miR1508a* 的启动子中含有 ABA、干旱和低温应答元件。大豆 *gma-miR160a* 启动子中也含有一些非生物胁迫应答元件^[25]。下一步将通过缺失或突变 *gma-miR1510a* 启动子中的这些顺式作用元件来验证元件的作用。

参考文献

[1] Zhang B H, Pan X P, Cobb G P, et al. Plant microRNA: A small regulatory molecule with big impact[J]. Developmental Biology, 2006, 289:3-16.
[2] Bartel D P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2):281-297.
[3] Llave C, Kasschau K D, Rector M A, et al. Endogenous and silencing associated small RNAs in plants[J]. Plant Cell, 2002, 14:1605-1619.
[4] 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(5589):2053-2056.

[5] Mallory A C, Reinhart B J, Bartel D, et al. A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and microRNAs in tobacco[J]. Proceedings of the National Academy of Science USA, 2002, 99:15228-1523.

[6] Marker C, Zemann A, Terhorst T, et al. Experimental RNomics: Identification of 140 candidates for small non-messenger RNAs in the plant *Arabidopsis thaliana* [J]. Current Biology, 2002, 12: 2002-2013.

[7] Park W, Li J J, Song R T, et al. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana* [J]. Current Biology, 2002, 12: 1484-1495.

[8] Reinhart B J, Weinstein E G, Rhoades M W, et al. MicroRNAs in plants[J]. Genes Development, 2002, 16:1616-1626.

[9] Alvarez J P, Pekker I, Goldshmidt A, et al. Endogenous and synthetic microRNAs stimulate simultaneous, efficient, and localized regulation of multiple targets in diverse species[J]. Plant Cell, 2006, 18(5):1134-1151.

[10] Schwab R, Ossowski S, Riester M, et al. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2006, 18(5):1121-1133.

[11] Tang Y, Wang F, Zhao J, et al. Virus-based microRNA expression for gene functional analysis in plants[J]. Plant Physiology, 2010, 153(2):632-641.

[12] Zhao T, Wang W, Bai X, et al. Gene silencing by artificial microRNAs in *Chlamydomonas* [J]. Plant Journal, 2009, 58(1): 157-164.

[13] Sablok G, Perez-Quintero A L, Hassan M, et al. Artificial microRNAs (amiRNAs) engineering - On how microRNA-based silencing methods have affected current plant silencing research[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011, 406(3):315-319.

[14] Warthmann N, Chen H, Ossowski S, et al. Highly specific gene silencing by artificial miRNAs in rice [J]. PLoS One, 2008, 3:e1829.

[15] Chen H, Jiang S, Zheng J, et al. Improving panicle exertion of rice cytoplasmic male sterile line by combination of artificial microRNA and artificial target mimic[J]. Plant Biotechnology Journal, 2013, 11:336-343.

[16] Pieczynski M, Marczewski W, Hennig J, et al. Down-regulation of *CBP80* gene expression as a strategy to engineer a drought-tolerant potato[J]. Plant Biotechnology Journal, 2013, 11:459-469.

[17] Zhang Z, Yu J, Li D, et al. PMRD: Plant microRNA database [J]. Nucleic Acids Research, 2010, 38(Database issue): D806-D813.

[18] Lescot M, Dehais P, Thijs G, et al. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences[J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(1):325-327.

[19] Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, et al. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database;1999[J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27(1):297-300.

[20] Dai X, Zhao P X. psRNA Target: A plant small RNA target analysis server[J]. Nucleic Acids Research, 2011, (Web Server issue): W155-159.

[21] Ossowski S, Schwab R, Weigel D. Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other smallRNAs [J]. Plant Journal, 2008, 53: 674-690.

[22] Urao T, Noji M, Yamaguchi-Shinozaki K, et al. A transcriptional activation domain of ATMYB2, a drought-inducible *Arabidopsis* Myb-related protein [J]. Plant Journal, 1996, 10(6): 1145-1148.

[23] Xu Z S, Ni Z Y, Li Z Y, et al. Isolation and functional characterization of *HvDREB1*—a gene encoding a dehydration-responsive element binding protein in *Hordeum vulgare* [J]. Journal of Plant Research, 2009, 122:121-130.

[24] 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.)

[25] 倪志勇, 于月华, 刘超, 等. 大豆 *gma-miR160o* 启动子的克隆及植物表达载体构建[J]. 华北农学报, 2015, 30(1): 19-23. (Ni Z Y, Yu Y H, Liu C, et al. Isolation of *gma-miR160o* promoter from *Glycine max* and construction of its plant expression vectors [J]. Acta Agriculturae Boreali-sinica, 2015, 30(1): 19-23.)