

日本落叶松小 RNA 文库构建及其 microRNA 鉴定

吴涛^{1,2}, 张俊红¹, 韩素英³, 杨文华¹, 李万峰¹, 齐力旺^{1*}

(1. 中国林业科学研究院林业研究所, 细胞生物学实验室, 北京 100091;

2. 云南省林业科学院, 云南省森林植物培育与开发利用重点实验室, 云南昆明 650201;

3. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 北京 100091)

摘要:以2年生日本落叶松实生苗为材料构建其小RNA文库,对283个克隆进行PCR验证后测序,通过生物信息学分析鉴定文库中的microRNA并进行qRT-PCR验证。结果表明:(1)小RNA文库的体积为50 mL,总库容量为 5.25×10^6 cfu,重组率为92.6%,插入片段长度约65 bp,与小RNA连接片段长度吻合。(2)去除rRNA(86个)、tRNA(14个)等非目的序列后,获得日本落叶松28个保守miRNAs,属于17个miRNA家族;其中,15个miRNAs(miR159c、miR160a、miR162a、miR164b、miR165a、miR166a、miR166a*、miR166b*、miR169a、miR169b、miR171a、miR171b、miR172a、miR319b、miR396a)的序列与其它植物完全一致,其余13个miRNAs(miR156a、miR159a、miR159b、miR164a、miR166b、miR168a、miR169b*、miR319a、miR396b、miR408、miR482a、miR2111、miR3701)则高度相似。(3)测序结果与本室落叶松转录组数据进行序列比对,新发现4个miRNAs(lle-miR1、lle-miR2、lle-miR3、lle-miR4)及其前体。(4)qRT-PCR验证表明,miR159a、miR159b等16个保守的和lle-miR1~lle-miR4等共20个miRNAs存在于日本落叶松中。(5)通过靶基因预测及UniProt数据库分析发现,32个miRNAs中有24个对应69个靶基因,其功能主要为转录因子、信号转导、胁迫抗性和代谢相关酶及未知功能蛋白。

关键词:日本落叶松;小RNA;文库;miRNA;转录组

中图分类号:S791.223

文献标识码:A

Construction of Small RNA Library and Characterization of MiRNAs in *Larix kaempferi*

WU Tao^{1,2}, ZHANG Jun-hong¹, HAN Su-ying³, YANG Wen-hua¹, LI Wan-feng¹, QI Li-wang¹

(1. Laboratory of Cell Biology, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China;

2. Yunnan Key Laboratory for Forest Plant Cultivation and Utilization, Yunnan Academy of Forestry, Kunming 650201, Yunnan, China;

3. Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: In this study, a small RNA library mixed equally sRNA of needle leaves, stem and root tissues was constructed for 2-year-old seedling of Japanese larch (*Larix kaempferi*). Two hundred and eighty three recombinants from library were partially selected randomly and sequenced. These sequenced sequences were searched and compared in Rfam, Repbase, miRBase and PMRD databases by BLASTN to remove rRNA, tRNA, snRNA snoRNA and other non-candidate small RNA. The results indicated that 28 miRNAs were acquired and these sequences were same (miR159c, miR160a, miR162a, miR164b, miR165a, miR166a, miR166a*, miR166b*, miR169a, miR169b, miR171a, miR171b, miR172a, miR319b, and miR396a) as or highly homologous (miR156a, miR159a, miR159b, miR164a, miR166b, miR168a, miR169b*, miR319a, miR396b, miR408, miR482a, miR2111, and miR3701) to other known plant miRNAs, which belonging to 17 miRNA families. Additional 4

收稿日期:2012-03-26

基金项目:国家自然科学基金重点项目(30830086);国家“973”项目(2009CB119106)资助;国家“863”计划重点项目(2011AA100203)

作者简介:吴涛(1979—),男,云南宣威人,博士研究生,研究方向:林木生物技术。

* 通讯作者:E-mail:lwqi@caf.ac.cn,电话:010-62888445

sequences could be matched to stem-arm sequences of stem-loop structure M-folded with our lab's transcriptome data (contigs/singlets). The 4 sequences could be characterized novel miRNAs of Japanese larch. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis demonstrated that 20 miRNAs were expressed in larch. The putative target genes of these miRNAs were predicted using psRNATarget online service. There were 69 targets obtained by the prediction for 24 miRNAs among 28 conserved and 4 novel larch miRNAs, which are highly enriched in transcription factor (TF), signal transduction protein, stress-induced-associate protein and other uncharacterized protein.

Key words: *Larix kaempferi*; small RNAs; library; miRNA; transcriptome

microRNA (miRNA) 作为近年来发现的一类非编码小 RNA (小 RNA, sRNA), 在动植物基因转录和转录后加工、细胞分化和个体发育、遗传和表观遗传等生命活动中发挥重要作用^[1]。1993 年, Lee 等在线虫中发现了首个 miRNA—*lin4*^[2], 近年的研究表明, miRNA 不但调控哺乳动物的器官发育, 而且其功能失调与癌症发生密切相关^[3-4]。同时, 植物研究发现, miRNA 生物合成的关键酶 *Dicer-like* (*DCL*) 发生突变, 则拟南芥胚胎、胚珠和花发育都严重抑制, 说明 miRNA 调控途径在植物生长发育过程中具有重要作用^[5]。miR160 通过调控控制根冠发育的生长素响应因子 *ARF10* 和 *ARF16* 的表达水平, 影响根冠和侧根的发育, 暗示 miRNA 在植物器官发育过程中起重要调控作用^[6-7]。Zhang 等^[8] 利用 miRNA 芯片对日本落叶松 (*Larix kaempferi* (Lamb.) Carr.) 胚性/非胚性细胞组织进行其表达谱分析, 发现 miR156、miR159、miR171 和 miR172 等 4 个 miRNA 家族在胚性与非胚性细胞组织中差异显著, 说明 miRNA 影响细胞组织胚性发生能力。

落叶松 (*Larix* spp.) 是我国北方中高山地区的重要纸浆材、建筑材及主要针叶造林树种。日本落叶松生长快、产量高、材质好、用途广, 引种栽培已有 80 余年历史。迄今, 关于落叶松的研究多集中于良种选育、杂交育种、种子园营建等遗传改良方面^[9-10], 并在配子体发育、扦插生根机理、光合生理特性等基础研究有重要进展^[11-13], 但基因水平调控方面的机理研究报道极少。本课题组近年来已经进行落叶松分子调控和分子机理的研究, 利用 SSH 技术构建杂种落叶松 (*L. kaempferi* × *L. olgensis*) 扦插生根的消减文库, 发现部分重要的差异表达基因^[14]; 同时, 还对日本落叶松 × 华北落叶松杂交种 (*L. kaempferi* × *L. principis-rupprechtii*) 体细胞胚成熟阶段的差异表达基因进行了研究, 结果表明: MAPKK、LP3-3 和 HSP70 等部分 ESTs 在落叶松体细胞胚胎发生的不同阶段特异表达^[15]。这些差异表达

的基因可以作为特定生长阶段或细胞类型的分子标记, 应用于特定性状的选育工作。本研究构建日本落叶松小 RNA 文库, 通过生物信息学方法和 qRT-PCR 技术对其 miRNA 进行鉴定和验证, 为建立针叶树 miRNA 分子研究体系提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

日本落叶松 2 年生实生苗采自辽宁省清源县大孤家林场国家级落叶松种子园苗圃, 是日永 14 母株天然传粉半同胞家系。选择健壮单株, 分别取根、茎和叶, 装入冻存管后立即置于液氮中保存, 直至使用。

1.2 研究方法

1.2.1 小 RNA 文库构建

1.2.1.1 小 RNA 的提取 用通用植物 microRNA 提取试剂盒 (BioTeKe) 提取日本落叶松根、茎、叶的小 RNA (sRNA)。取 50 ~ 100 mg 材料用液氮研磨; 裂解抽提后过柱, 漂洗后用 RNase-free H₂O 重复洗脱 2 次可充分获取 200 nt 以下的 sRNA。用超微量核酸蛋白测定仪 ND1000 (NanoDrop Technologies, USA) 检测核酸浓度和 OD 值, 用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 sRNA 质量。用核酸共沉剂试剂盒 (TaKaRa) 结合超低温沉淀法进行 sRNA 富集。将富集的根、茎和叶的 sRNA 等量混合后用于 sRNA 文库构建。

1.2.1.2 小 RNA 文库构建 日本落叶松 sRNA 文库构建采用 miRNA 克隆试剂盒 miRCat™ microRNA Cloning Kit (IDT) 进行。除 PCR 扩增和克隆步骤稍作修改外, 其它操作过程参照说明书和 miRNA 克隆方法 (<http://web.wi.mit.edu/bartel/pub/protocols/miRNAcloning.pdf>)。具体步骤如下: (1) 3' 接头连接: T4 RNA 酶在无 ATP 条件下将经过修饰的 3' 接头连接到小 sRNA 3' 端。(2) 3' 连接产物的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳及纯化, 获得约 40 nt 连接产

物。(3) 5'接头连接反应,获得约62 nt连接产物。(4) 反转录:按照 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas)说明书(Fermentas)进行反应。(5) PCR扩增:反转录产物稀释20倍后用于PCR扩增,扩增程序:95℃,5 min;35个循环:95.0℃,30 s;52.0℃,30 s;72℃,30 s;72℃延伸5 min。(6) 连接转化:PCR产物用pUM-T快速克隆试剂盒(BioTeKe)进行T-A载体连接并转化TOP10感受态细胞(TRANSGENE)。(7) 涂板培养:转化细胞涂板18 cm培养皿5皿,过夜培养。随机挑取单克隆菌落进行PCR检验。(8) 刮板获得sRNA文库:待单克隆长至直径2 mm时,用含100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素(Amp)的SOC液体培养基冲洗平皿,获得含有转化目的片段的混合菌液50 mL,此混合菌液即为sRNA文库。将混合菌液与70%甘油等量混合,混匀后分装到2 mL冻存管中,先于液氮中速冻,最后-80℃保存备用。

1.2.2 重组克隆PCR检测及测序 取1支2 mL文库菌液于SOC/Amp平板涂板培养,用灭菌牙签随机蘸取10个单菌落,过夜振荡培养后用M13F、M13R引物进行菌液PCR,PCR产物用2%琼脂糖凝胶电泳检测片段大小;同时,选取PCR产物片段大小在65 bp左右的283个重组克隆子进行测序。

1.2.3 miRNA鉴定 重组克隆测序获得的序列先通过Rfam(<http://rfam.sanger.ac.uk>)进行在线搜索,排除已知的rRNA、tRNA、snRNA和snoRNA^[16],剩余序列经Rebase(<http://www.girinst.org>)过滤^[17],无同源性的序列在miRBase(<http://www.mirbase.org>)和PMRD(<http://bioinformatics.cau.edu.cn/PMRD>)数据库已知miRNA中进行查询^[18-19],序列相同或高度相似则鉴定为日本落叶松与其它植物物种保守的miRNAs。

用本室日本落叶松转录组数据(contigs/singlets)作为查询库对剩余序列进行搜索,将完全一致的转录组序列用Mfold软件(<http://mfold.rna.albany.edu>)在线进行二级结构预测。当候选miRNA位于二级茎环结构的臂上,并满足Meyers等^[20]对植物miRNA的命名要求,则确认为日本落叶松新鉴定的miRNA。

1.2.4 靶基因预测 利用植物miRNA在线预测软件—psRNATarget(<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>),以日本落叶松保守的和新鉴定的miRNA序列为查询序列,以本室日本落叶松转录组数据

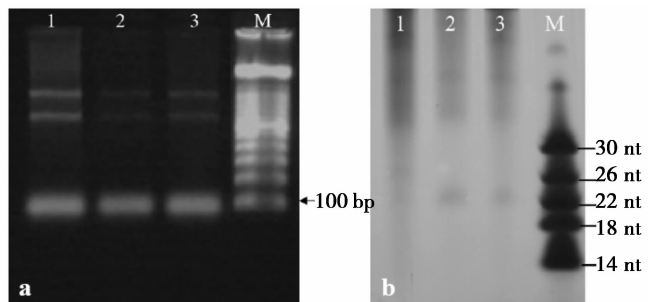
作为靶基因筛选库,对日本落叶松的miRNA进行靶基因预测。筛选标准和参数设为默认^[21]。预测得分 ≤ 3.0 的序列再人工进行调整作为miRNA的候选靶基因。靶基因功能在UniProt数据库(<http://www.uniprot.org/>)中根据GO分类系统进行注释。

1.2.5 miRNA验证 根据候选的日本落叶松miRNA序列,通过软件Primer Express3.0分别设计引物。以等量混合2年生实生苗的根、茎和叶的小RNA样品做模板,用miRNA反转录和定量试剂盒miRNA cDNA Synthesis Kit and miRNA qRT-PCR Kits(Invitrogen),依次进行反转录和qRT-PCR,对候选miRNA进行验证。操作和参数设定参照说明书。qRT-PCR仪为ABI 7500(Applied Biosystems,USA),每个反应3次重复。qRT-PCR程序为:95℃,2 min;40个循环:95℃,15 s;60℃,1 min。扩增曲线结束后执行熔解曲线分析并结合电泳对PCR产物进行单一性检验。

2 结果与分析

2.1 小RNA文库构建结果

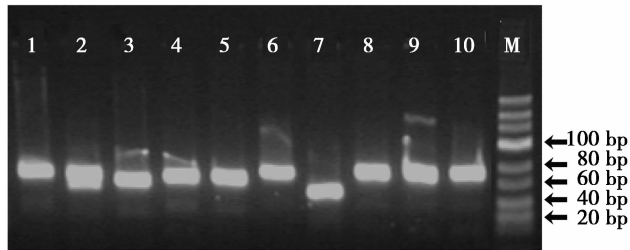
2.1.1 小RNA的提取 根、茎和叶组织所提取的sRNA经ND1000检测,结果显示A260/280为1.80~1.95,A260/230的比值大于1.5,说明提取的小RNA纯度满足要求。sRNA的初始浓度为30~50 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,得率为18~30 $\text{ng} \cdot \text{mg}^{-1}$;富集后的浓度为706.6~1358.9 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。提取的sRNA在2%琼脂糖凝胶泳道100 bp位置下方形成单一清晰条带,说明此提取方法获得100 nt左右的sRNA片段(图1a)。用15%变性PAGE胶进一步验证,发现sRNA呈连续带状,且在22 nt附近形成较为集中的带型(图1b),说明本研究提取的sRNA中含有20~24 nt长度的RNA,符合sRNA文库构建要求。



a:琼脂糖电泳;b:PAGE电泳;1~3依次为叶、茎、根;M:Marker

图1 小RNA的质量检测结果

2.1.2 小 RNA 文库克隆的检验 对 sRNA 文库菌液进行平板培养,单菌落数量统计结果表明:文库的滴度为 $1.05 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$,50 mL 文库的总容量为 $5.25 \times 10^6 \text{ cfu}$ 。重组克隆 PCR 检测结果表明,10 个克隆的 PCR 产物长度为 60 ~ 80 bp(图 2),符合 sRNA 连接产物的长度范围,表明克隆中含有目标 sRNA 序列。



1 ~ 10: 重组克隆; M: Marker

图 2 日本落叶松小 RNA 文库的部分重组克隆的 PCR 结果

2.2 miRNA 的鉴定

2.2.1 保守 miRNA 的鉴定 对 283 个克隆测序结果进行分析,除去无插入目的 sRNA 片段的结果(39)和出现 N 值无法判别的无效序列(21),共获得 223 个有效序列,含有 18 ~ 26 bp 插入片段的质粒为 201 个,占有有效序列数的 90.13%。

223 个有效序列排除 rRNA、tRNA、snRNA 和 snoRNA 等非蛋白编码 RNA 和 mRNA 降解产物以外,最后得到日本落叶松 28 个保守的和 18 个待定的 miRNA 序列(表 1)。

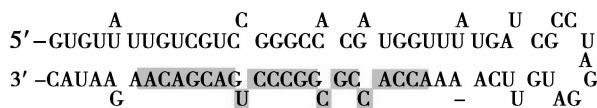
日本落叶松保守的 28 个 miRNAs 序列与 miR-Base 和 PMRD 数据库搜索结果表明,其与已知植物 miRNA 序列完全相同或高度相似(不多于 3 个碱基有差异),属于 17 个家族,其中,miR166 家族有 4 个

表 1 克隆质粒有效序列的比对分析结果

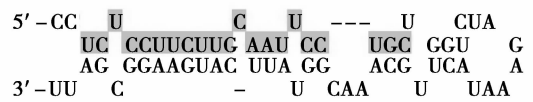
类别	数量/个	比例/%
小于 18 nt 或大于 26 nt 的序列	22	9.87
rRNA	86	38.57
tRNA	14	6.28
snoRNA & snRNA	5	2.24
mRNA	24	10.76
siRNA 或其它小分子 RNA	26	11.66
保守 miRNA	28	12.56
待定 miRNA	18	8.07
总计	223	100.00

成员,并且 2 个为 miRNA* (DCL 酶切割前体 miRNA 发夹结构形成的 miRNA; miRNA* duplex 中,与成熟 miRNA 相对应的另一个 miRNA); miR159 和 miR169 的成员数都有 3 个; miR164、miR171、miR319 和 miR396 有 2 个;其余家族仅有 1 个(表 2)。鉴定的保守 miRNA 序列中,有 20 个(71%)长度为 21 nt,是 miRNA 主要的长度类型,与 Dolgosheina 等^[22]和 Lu 等^[23]对针叶树 miRNA 的研究结果一致。28 个 miRNA 中有 21 个(75%)是以 U 开头的,这是 miRNA 的一个共同特征。

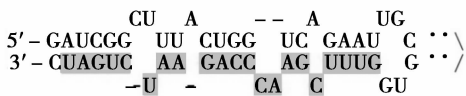
2.2.2 日本落叶松新 miRNA 的鉴定 以本室日本落叶松转录组数据作对象库,用克隆测序获得的 18 个日本落叶松待定的 miRNA 序列进行比对,将含有与 miRNA 相同序列的转录组数据用 Mfold 软件在线进行二级结构预测,结果表明:18 个待定 miRNAs 中有 4 个 miRNAs 位于二级茎环结构的某一侧臂上(图 3),鉴定为日本落叶松新发现的 miRNA; 剩余 14 个待定 miRNA 有待补充 EST 序列后进一步研究。



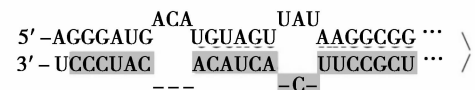
a) lle-miR1 stem-loop



b) lle-miR2 stem-loop



c) lle-miR3 stem-loop



d) lle-miR4 stem-loop

图 3 日本落叶松新鉴定的 miRNA 在茎环结构上的位置

2.3 miRNA 靶基因的预测

以落叶松转录组数据作为靶基因筛选库,对日本落叶松 28 个保守的和 4 个新鉴定的 miRNA 进行靶基因生物信息学分析。结果表明:32 个日本落叶

松 miRNAs 除 miR159c、miR166a*/b*、miR169b*、miR171a、miR408、lle-miR1 和 lle-miR4 在筛选库中未预测到靶基因外,其余 24 个 miRNAs 所预测的 69 个靶基因多为已知植物 miRNA 靶基因的同源物和

表2 日本落叶松与其它植物共同保守的 miRNA

家族	成员	序列 (5'-3')	长度 /nt	参考物种 ^①	相似性 ^②
miR156	miR156a	UGACAGAAGAGAGUGGGCAC	20	ath, osa, pta, ptc 等	H
miR159	miR159a	UUUGGUUUGAAGGGAGCUCUA	21	ath, gma, ptc, vvi 等	H
miR159	miR159b	UUUGGAGUGAAGGGAGCUCC	20	ath, gma, ptc, zma 等	H
miR159	miR159c	ACUUGGAUUGAAGGGAGCUCCU	22	ptc, sof, sbi, zma 等	S
miR160	miR160a	UGCCUGGCUCUUGUAUGCCA	21	ath, osa, ptc, pab 等	S
miR162	miR162a	UCGAUAAAACCUCUGCAUCCAG	21	ath, osa, ptc, vvi 等	S
miR164	miR164a	UGGAGAAGCAGGGCACUUGCC	21	ath, far, ptc, osa 等	H
miR164	miR164b	UGGAGAAGCAGGGCACGUGCC	21	ath, aly	S
miR165	miR165a	CCGGACCAGGCUUCAUCCCC	21	ath, osa, pta, ptc 等	S
miR166	miR166a	UCGAUCAGGCUUCAUCCUC	21	osa	S
miR166	miR166b	UCUCGGACCAGGCUUCAUCC	21	bdi, gma, pta, ptc 等	H
miR166	miR166a *	GGACUGUUGUCUGGCUCGAGG	21	aly	S
miR166	miR166b *	GGAAUGUUGUCUGGCUCGAGG	21	aly, esi, gma, zma 等	S
miR168	miR168a	UCGAUUGGUGCAGAUCCGGA	20	ath, ptc, osa, zma 等	H
miR169	miR169a	CAGCCAAGGAUGACUUGCCGG	21	ath, mtr, osa, ptc 等	S
miR169	miR169b	UAGCCAAGGAUGACUUGCCUC	21	ath, osa, ptc, zma 等	S
miR169	miR169b *	GCGGAGUUGUCCUUGGCUAC	20	aly, zma	H
miR171	miR171a	UUGAGCCGCGCCAAUAUCACU	21	ssl, vvi	S
miR171	miR171b	UGAUUGAGCCGUGCCAAUAUC	21	ptc, osa, vvi, zma 等	S
miR172	miR172a	AGAAUCUUGAUGAUGCUGCAU	21	ath, gma, osa, ptc 等	S
miR319	miR319a	UUUGGACUGAAGGGAGCUCCC	21	ath, gma, ptc, ppt 等	H
miR319	miR319b	UUUGGACUGAAGGGAGCUCCU	21	esi, tec, vvi 等	S
miR396	miR396a	UCCACAGCUUUCUUGAACUUAU	22	pab, vvi	S
miR396	miR396b	UCCACGGCUUUCUUGAACUUC	21	ath, osa, pab, ptc 等	H
miR408	miR408	UGCACUGCCUCUUCUCCUGGUU	21	ath, pta, ptc, ppt 等	H
miR482	miR482a	UUUCCCUACUCCUCCCAUCC	22	pab, pta, ptc, vvi 等	H
miR2111	miR2111	UAAUCUGCAUCCUGAGGUUUG	21	aly, ath, mtr, vvi 等	H
miR3701	miR3701	UAAACAAUGCCACCCUUAUC	22	pab	H

注:① aly: 琴叶拟南芥 (*Arabidopsis lyrata* (L.) O.Kane & Al-Shehbaz); ath: 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh); bdi: 二穗短柄草 (*Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv.); esi: 甜橙 (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck); far: 苇状羊茅 (*Festuca arundinacea* Schreb.); gma: 大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.); osa: 水稻 (*Oryza sativa* L.); pab: 欧洲云杉 (*Picea abies* (L.) H. Karst); pta: 火炬松 (*Pinus taeda* L.); ptc: 毛果杨 (*Populus trichocarpa* Torr. & A. Gray); sbi: 高粱 (*Sorghum bicolor* (L.) Moench); sof: 甘蔗 (*Saccharum officinarum* L.); ssl: 香紫苏 (*Salvia sclarea* L.); tec: 可可 (*Theobroma cacao* L.); vvi: 葡萄 (*Vitis vinifera* L.); zma: 玉米 (*Zea mays* L.)。②S: 完全一致, 表明日本落叶松 miRNA 与其它植物的 miRNA 序列相同; H: 高度相似, 表明日本落叶松 miRNA 与其它植物的 miRNA 序列的碱基差异不超过 3 nt。

未注释功能蛋白(表3)。

新鉴定的 miRNA 中, lle-miR2 预测的靶基因是转录因子 MYB 和疾病抗性相关蛋白 TIR//NBS / LRR 等, lle-miR3 是激酶和小 G 蛋白等, lle-miR1 和 lle-miR4 用设定参数没有预测到可能的靶基因。所有日本落叶松的 miRNAs 的靶基因预测结果表明, 靶基因主要是转录因子、信号转导、胁迫抗性相关蛋白及部分功能未知蛋白编码基因, 功能涉及日本落叶松生长发育的各个层面。

2.4 miRNA 的 qRT-PCR 验证

根据本研究克隆鉴定的 32 个日本落叶松 miRNA 序列信息分别设计引物, qRT-PCR 结果表明: 除 miR159c、miR164b、miR166b、miR166b*、miR169b*、

miR319b、miR396b 和 miR3701 的引物无效以外, 其余 24 条引物均能有效工作, 其中, 22 条引物在 40 个扩增循环结束前扩增曲线达到平台期, 2 条引物无扩增结果 (miR156a 和 miR166a), 2 条引物的非模板对照 (NTC) 出现扩增条带 (miR165a 和 miR319a)。溶解曲线和琼脂糖凝胶电泳分析表明: 20 条引物产生单一扩增产物, 且非模板对照 (NTC) 无扩增条带 (图 5)。理论上, 进一步针对无效引物和扩增效果不好的 miRNA 序列再次设计引物, 优化退火温度, 将可以获得好的扩增结果。qPT-PCR 结果既验证了日本落叶松 miRNA 的鉴定结果, 其实验参数的获得也为后续的 miRNA 表达分析奠定基础。

表3 日本落叶松 miRNA 靶基因的预测

miRNA	靶基因编号	靶基因注释	功能
miR156a	JR140411	GRAS transcription factor	转录因子
miR159a	JR153328	phosphoinositide 5-phosphatase	信号转导
miR159a	JR160161	zeaxanthin epoxidase	信号转导
miR159a	JR154839	WOX	转录因子
miR159a	JR195776	CbbY-like	转录因子
miR159b	JR155261	unknown	未知
miR160a	JR145514	ARF10	转录因子
miR162a	JR183759	membrane-associated protein	膜成分
miR162a	JR142193	unknown	未知
miR164a	JR143302	U2 snRNP subunit	核糖体成分
miR164a	JR153819;JR168951	unknown	未知
miR164b	JR168511	CUP-SHAPED COTYLEDON	转录因子
miR165a	JR140760	HD-Zip	转录因子
miR166a	JR169506	BBM-like	转录因子
miR166a	JR140334	bZIP	转录因子
miR166a	JR165899	unknown	未知
miR166b	JR164864	glutamate carboxypeptidase	催化水解
miR166b	JR180969	serine/threonine protein kinase	信号转导
miR168a	JR151597;JR153715	unknown	未知
miR169a	JR190168	转录因子 CCAAT	转录因子
miR169a	JR151729;JR162099	unknown	未知
miR169b	JR163922;JR165108;JR166916	unknown	未知
miR171b	JR142968	ATP binding protein	转录因子
miR171b	JR150168	unknown	未知
miR172a	JR149479	C3H4 type zinc finger protein	转录因子
miR172a	JR168642	polyadenylate-binding protein 2	转录因子
miR172a	JR148152	serine/arginine rich splicing factor	翻译调控
miR172a	JR161292	succinyl-CoA synthetase	生物合成
miR172a	JR155321;JR184907;JR154713	unknown	未知
miR319a	JR147280	dual specificity protein	信号转导
miR319b	JR148348	unknown	未知
miR396a	JR142073	ureide permease	分子转运
miR396b	JR167342	Elongation factor Tu	翻译调控
miR396b	JR143388	small heat-shock protein	疾病抗性
miR396b	JR141466;JR178381;JR194062	unknown	未知
miR396b	JR155621	farnesyl diphosphate synthase	生物合成
miR396b	JR184009	ubiquinone	电子传递
miR482a	JR154621	SGS3	转录因子
miR482a	JR160261	CAMKK	信号转导
miR482a	JR149618;JR152233;JR174150	unknown	未知
miR2111	JR166689;JR171723	F-box family protein	转录因子
miR2111	JR151198	tubulin, beta chain	微管成分
miR2111	JR190037	unknown	未知
miR3701	JR184781	NBS	疾病抗性
miR3701	JR182460	unknown	未知
lle-miR2	JR148663;JR170656;JR176169	TIR/NBS/LRR	疾病抗性
lle-miR2	JR144571	MYB	转录因子
lle-miR2	JR158178;JR173291;JR193791	unknown	未知
lle-miR3	JR152546	MAP kinase	信号转导
lle-miR3	JR155307	Sar1-family small GTPase	信号转导
lle-miR3	JR142605;JR144805;JR188574	unknown	未知

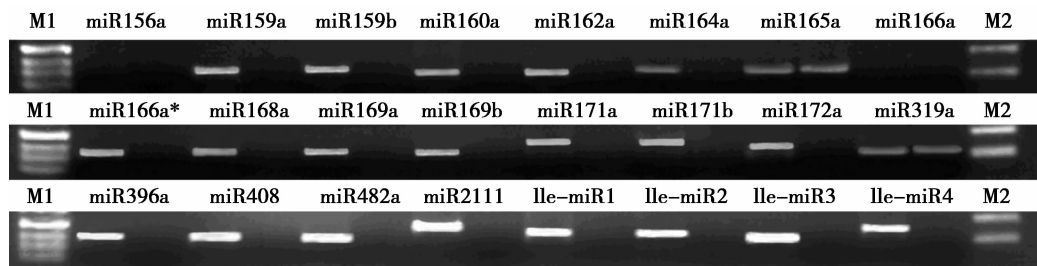


图4 日本落叶松 miRNA 的 qRT-PCR 验证结果

3 结论与讨论

3.1 小RNA文库构建要求高质量的小RNA

构建1个高质量的小RNA文库对起始小RNA的质量和浓度要求非常高。本实验通过ND1000和琼脂糖凝胶电泳、变性聚丙烯酰胺凝胶电泳等多种检测方法对所提取的日本落叶松根、茎、叶的小RNA进行定性及定量检测,结果表明:实验获得的小RNA含有20~24 nt目标片段,浓度高,OD260/OD280比值大于1.80,质量好。小RNA的浓度和质量完全达到文库构建要求;同时,在文库构建过程中,从接头连接到反转录合成cDNA等各个环节,都严格施行连接产物和反转录产物大小检测,对其进行质量监控,保证最终获得高质量的小RNA文库。

miRNA数据库miRBase 18.0收录的前体miRNA序列信息包括人类、动物、植物、病毒等共18 226条,其中,共有52种植物的4 014条前体miRNA信息,裸子植物仅有火炬松(*Pinus taeda*)和欧洲云杉(*Picea abies*)2种针叶树的37条和40条前体信息。针叶树种miRNA数据缺乏主要是由于其基因组庞大,如火炬松基因组大小为 2×10^{10} bp,超过人类基因组 3×10^9 bp,测序难度大。另一方面,针叶树的EST序列也较为有限,使得日本落叶松miRNA的计算机预测缺少数据来源,无法像拟南芥^[24]、玉米^[25]和果树^[26]等拥有数万条ESTs的植物那样获得有效预测结果。本研究通过建库克隆测序的方法获得日本落叶松32个miRNAs序列,丰富了现有miRBase数据库,尤其是裸子植物的miRNA数据信息。火炬松^[23]和欧洲云杉^[27]的miRNA信息也是通过构建sRNA文库并克隆测序获得的。

3.2 miRNA注释标准与检测方法

根据目前植物miRNA注释的主要标准,即miRNA/miRNA*复合体位于发夹前体反向的两臂上,3'端有2 nt的悬垂;miRNA与包括miRNA*的另一臂序列,二者的碱基错配通常 ≤ 4 碱基等的要求^[20, 28],

本研究新鉴定的miRNA满足这些标准。同时,获得的28个日本落叶松保守miRNAs序列中,有的与其它植物完全相同或几乎相同,例如miR159、miR160、miR166、miR171、miR172家族成员与其它被子植物、裸子植物和藓类植物miRNA序列完全一致或仅1个碱基存在差异,表明这些miRNAs在陆地植物中是高度保守的,在植物生长发育分子调控网络中是保守进化的。

Northern Blot是miRNA检测的传统方法,但难于区别大小相同而组成仅相差1~2个碱基、具高度相似性的序列,并且需要设计特异的探针,费用高且通量有限。基因芯片是高通量检测miRNA的一种方法,但其费用高,后期数据处理难度大。本研究采用的qRT-PCR方法,能够对miRNA成熟体进行专一性检测,灵敏度高,能够检测100 pg总RNA中包含的miRNA;特异性强,甚至一个碱基的差异都能区分,这非常有利于对同一家族不同成员的miRNA进行检测^[29]。本研究用qRT-PCR技术对所鉴定的32个miRNA进行了验证,检测到62.5% (20/32)的miRNA的表达扩增。其余miRNA未能成功进行扩增,最主要的原因可能是引物设计需要优选,因为miRNA成熟体序列仅约21 nt,引物设计难度大,需要进行更多的引物尝试。

Zhang等^[8]利用包含有毛果杨、拟南芥和水稻等物种的2 500个探针芯片对日本落叶松胚性/非胚性细胞组织进行miRNA表达谱分析,发现4个miRNA家族在2种细胞组织中的表达差异极显著,胚性细胞组织中miR171表达量高,非胚性细胞组织中miR159、miR169和miR172表达量高。该研究对于鉴别胚性和非胚性细胞组织具有重要指导价值,也能为以后胚性细胞组织定向诱导提供科学依据;而本研究所鉴定的miRNA中就存在这4个miRNA家族成员,并且是通过建库克隆测序鉴定的,其序列能够直接用于日本落叶松miRNA相关研究。

3.3 miRNA 靶基因分析能够为功能研究提供信息

miRNAs 靶基因的预测,有助于揭示 miRNAs 在基因表达调控中的作用,对于 miRNA 的功能诠释和基因调控通路研究具有重要价值。本研究选用的2年生日本落叶松实生苗正处于旺盛的生长发育和形态建成阶段,其中涉及内源激素调控通路的靶基因 ARF(miR160 的靶基因)能够对顶端分生组织建立和根冠发育等形态建成过程具有调控作用^[7],TCP(miR319 的靶基因)可以激活茉莉酸主要合成酶 LIPOXYGENASE2(LOX2)进而增加茉莉酸的表达,从而延缓衰老^[30],这些 miRNA 与其靶基因的调控及下游通路的深入研究有助于加强针叶树种生长发育机理的认识。动物 miRNA 的靶基因常常有上百个,植物 miRNA 的靶基因相对较少,这些靶基因通常具有调控功能,比如转录因子和 F-box 蛋白,这使得 miRNA 处于植物发育基因表达调控的中心位置。本研究中,落叶松 miRNA 靶基因预测结果表明,靶基因主要是转录因子,另外还可能将诸如蛋白水解、代谢、离子运输以及信号转导途径中的多种 mRNA 作为目标进行降解或阻碍其翻译,这充分显示 miRNA 具有重要的生物学意义,其在基因表达中的作用是广泛的。

参考文献:

[1] Sun G. MicroRNAs and their diverse functions in plants [J]. *Plant Molecular Biology*, 2012, 80(1): 17-36

[2] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes 小 RNAs with antisense complementarity to *lin-14* [J]. *Cell*, 1993, 75(5): 843-854

[3] Schrott G M, Tuebing F, Nigh E A, et al. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development [J]. *Nature*, 2006, 439(7074): 283-289

[4] Lu J, Getz G, Miska E A, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers [J]. *Nature* 2005, 435(7043): 834-838

[5] Schauer S E, Jacobsen S E, Meinke D W, et al. DICER-LIKER1: blind men and elephants in *Arabidopsis development* [J]. *Trends in Plant Science*, 2002, 7(11): 487-491

[6] 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]. *Plant Cell*, 2005, 17(8): 2204-2216

[7] Gutierrez L, Bussell J D, Pacurac D I, et al. Phenotypic plasticity of adventitious rooting in *Arabidopsis* is controlled by complex regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR transcripts and microRNA abundance [J]. *Plant Cell*, 2009, 21(10): 3119-3132

[8] Zhang S G, Zhou J M, Han S Y, et al. Four abiotic stress-induced miRNA families differentially regulated in the embryogenic and non-embryogenic callus tissues of *Larix leptolepis* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 2010, 398(3): 355-360

[9] 田志,董健,王喜武等. 日本落叶松育林学[M]. 北京: 北

京农业大学出版社, 1995: 1-192

[10] 马常耕,孙晓梅. 我国落叶松遗传改良现状及发展方向[J]. *世界林业研究*, 2008, 21(3): 58-63

[11] 贾桂霞,李凤兰,沈熙环. 华北落叶松雌配子体的形成及胚胎发育[J]. *北京林业大学学报*, 1994, 16(2): 10-14

[12] 王建华,孙晓梅,王笑山等. 母株年龄、激素种类及其浓度对日本落叶松扦插生根的影响[J]. *林业科学研究*, 2006, 19(1): 102-108

[13] 许晨璐,孙晓梅,张守攻等. 日本落叶松×长白落叶松杂种光合性状的父、母本效应研究[J]. *林业科学研究*, 2011, 24(1): 8-12

[14] 冯健,齐力旺,孙晓梅等. 落叶松扦插生根过程 SSH 文库构建及部分基因的表达分析[J]. *林业科学*, 2010, 46(6): 27-34

[15] 张蕾,齐力旺,韩素英. 落叶松体细胞胚成熟阶段差异表达的基因及部分基因的表达谱分析[J]. *遗传*, 2009, 31(5): 540-545

[16] Griffiths-Jones S, Bateman A, Marshall M, et al. Rfam: an RNA family database [J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(1): 439-441

[17] Kapitonov V V, Jurka J. A universal classification of eukaryotic transposable elements implemented in Repbase [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2008, 9(5): 411-412, 414

[18] Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data [J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(Database issue): D152-157

[19] Zhang Z H, Yu J Y, Li D F, et al. PMRD: plant microRNA database [J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(Database issue): D806-D813

[20] Meyers B C, Axtell M J, Bartel B, et al. Criteria for annotation of plant MicroRNAs [J]. *Plant Cell*, 2008, 20(12): 3186-3190

[21] Dai X, Zhao P X. psRNATarget: a plant 小 RNA target analysis server [J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(Web Server issue): W155-159

[22] Dolgosheina E V, Morin R D, Aksay G, et al. Conifers have a unique 小 RNA silencing signature [J]. *RNA*, 2008, 14(8): 1508-1515

[23] Lu S, Sun Y H, Amerson H, et al. MicroRNAs in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) and their association with fusiform rust gall development I [J]. *The Plant Journal*, 2007, 51(6): 1077-1098

[24] Li Y, Li W, Jin Y X. Computational identification of novel family members of microRNA genes in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* [J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2005, 37(2): 75-87

[25] Zhang BH, Pan XP, Anderson TA. Identification of 188 conserved maize microRNAs and their targets [J]. *FEBS Letters*, 2006, 580: 3753-3762

[26] 宋长年,贾启东,王晨,等. 32 种果树 microRNA 的生物信息学预测与分析 [J]. *园艺学报*, 2010, 37(6): 869-879

[27] Yakovlev I A, Asante D K, Fossdal C G, et al. Differential gene expression related to an epigenetic memory affecting climatic adaptation in Norway spruce [J]. *Plant Science*, 2011, 180(1): 132-139

[28] Ambros V, Bartel B, Bartel D P, et al. A uniform system for microRNA annotation [J]. *RNA*, 2003, 9(3): 277-279

[29] Shi R, Chiang V L. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR [J]. *Biotechniques*, 2005, 39(4): 519-525

[30] Schommer C, Palatnik J F, Aggarwal P, et al. Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets [J]. *Plos Biology*, 2008, 23, 6(9): e230:1991-2001