

gma-miR1507a生物信息学分析、植物表达载体的构建及遗传转化

马玲 崔晓霞 黄颜众 赵晋铭 王海棠 郭娜* 邢邯*

(国家大豆改良中心, 农业部大豆生物学与遗传育种重点实验室,
作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京农业大学, 南京 210095)

摘要 miRNA(microRNA)是一类长度为18~25 nt的内源性非编码小分子RNA, 通过对其靶基因mRNA的降解或抑制翻译来调控基因表达, 进而参与调控植物相关的生理活动。该研究分析gma-miR1507a的成熟体序列、茎环结构和前体启动子区域的顺式作用元件并检测了逆境处理下大豆组织中gma-miR1507a的水平; 使用psRNATarget在线软件预测了gma-miR1507a的靶基因; 构建植物表达载体amiRNA1507a-pCAMBIA2301并转化大豆子叶, 获得了发状根。结果发现, gma-miR1507a前体的启动子区域存在与干旱胁迫和病菌侵染相关的顺式作用元件; 在线软件psRNATarget预测到9个gma-miR1507a的靶基因; 该研究利用发状根介导的遗传转化结合GFP染色, 确定阳性发状根; 在转基因根毛中, gma-miR1507a水平与空载相比显著提高, 预测的部分靶基因表达量显著下调。以上结果显示, 过表达amiRNA1507a能够提高大豆发状根中gma-miR1507a水平, 为研究gma-miR1507a的功能奠定基础。同时, gma-miR1507a可能参与调控大豆的逆境胁迫。

关键词 gma-miR1507a; 顺式作用元件; 靶基因预测; amiRNA1507a表达载体构建; 发根农杆菌转化

Bioinformatic Analyses of gma-miR1507a, Construction of Plant Expression Vectors and Genetic Transformation

Ma Ling, Cui Xiaoxia, Huang Yanzhong, Zhao Jinming, Wang Haitang, Guo Na*, Xing Han*

(National Center for Soybean Improvement, Key Laboratory of Biology and Genetics and Breeding for Soybean, Ministry of Agriculture, P. R. China, State Key Laboratory of Crop Genetics & Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract miRNA (microRNA) are a class of endogenous and noncoding small molecular RNA with approximately 18-25 nucleotides (nt) in length. They can regulate gene expression through mRNA cleavage or translation inhibition. We analyzed the mature sequence, stem-loop structure and promoter sequence of gma-miR1507a. The level of gma-miR1507a in soybean tissue under stress was tested by stem-loop RT-PCR method.

收稿日期: 2017-02-24 接受日期: 2017-05-16

国家自然科学基金(批准号: 31301340)、江苏省自然科学基金(批准号: BK20130684)、国家公益性行业(农业)科研专项经费(批准号: 201303018)、转基因生物新品种培育重大专项经费(批准号: 2016ZX08004002-005)、长江学者和创新团队发展计划(批准号: PCSIRT13073)、大豆现代产业技术体系(批准号: CARS-004-PS10)和江苏省现代作物生产协同创新中心资助的课题

*通讯作者。Tel: 025-84399523, E-mail: guona@njau.edu.cn; Tel: 025-84399526, E-mail: hanx@njau.edu.cn

Received: February 24, 2017 Accepted: May 16, 2017

This work was supported by National Natural Science Foundation of China (Grant No.31301340), Natural Science Foundation of Jiangsu Province (Grant No.BK20130684), Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (Grant No.201303018), Genetically Modified Organisms Breeding Major Projects (Grant No.2016ZX08004002-005), Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (Grant No.PCSIRT13073), Modern Agro-industry Technology Research System of China (Grant No.CARS-004-PS10) and Jiangsu Collaborative Innovation Center for Modern Crop Production

*Corresponding authors. Tel: +86-25-84399523, E-mail: guona@njau.edu.cn; Tel: +86-25-84399526, E-mail: hanx@njau.edu.cn

网络出版时间: 2017-06-05 12:13:10 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170605.1213.004.html>

The target genes of gma-miR1507a were predicted by the online software *psRNATarget*. Then, we constructed artificial miRNA expression vectors-miRNA1507a-pCAMBIA3301. Furthermore, amiRNA1507a gene was overexpressed in soybean cotyledon and the transgenic hairy roots were obtained. The results showed that there were a number of cis-acting elements related to drought stress and pathogen infection in the promoter sequence of precursor gma-miR1507a and 9 target genes of gma-miR1507a were predicted. We obtained the transgenic hairy roots by hairy root-mediated genetic transformation system and GFP staining. The expression level of gma-miR1507a in the transgenic hairy roots significantly increased compared with that in empty vector. The expression of seven predicted target genes significantly reduced in transgenic hairy roots. Based on the results, the transgenic hairy roots of amiRNA1507a overexpression could increase the expression of gma-miR1507a which could be used to analyze the function of gma-miR1507a. In addition, gma-miR1507a may involve in biotic stresses responses in soybean.

Keywords gma-miR1507a; cis-acting elements; target gene predict; construction of amiRNA expression vector; agrobacterium-mediated transformation

微RNA(microRNA, miRNA)是一段仅有18~25个核苷酸(nucleotide, nt)的小分子RNA,广泛存在于生物体中。miRNA最早是由Lee等^[1]在秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)中发现的,之后,在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[2]、水稻(*Oryza sativa*)^[3]、小麦(*Triticum aestivum*)^[4]等多种植物体内均有发现。随着克隆和测序技术的迅速发展,miRNA的研究越来越深入。研究人员发现,miRNA在植物生长发育、耐逆和抗病等方面起着重要的调节作用。miRNA是一类由内源基因编码的非编码RNA,通过对其靶基因的mRNA的降解或抑制翻译来调控基因表达,进而参与调控植物相关生理活动^[5]。

Baumberger等^[6]的研究结果显示,植物miRNA可以通过与AGO(ARGONAUTE)蛋白质结合来指导对靶mRNA切割。与动物的miRNA不同,植物miRNA可以与其靶基因高度互补^[7-9]。在植物中,miRNA是由MIR基因编码而来,在RNA聚合酶II的作用下转录成为一段长的miRNA前体(pri-miRNAs)结构^[10-12]。利用以上特点,可以采用生物信息学的方法分析miRNA的靶基因和前体启动子区域的顺式作用元件。

大豆(*Glycine max* [L.] Merr.)原产于中国,是世界主要的食用油和植物蛋白质来源之一^[13]。大豆生长发育受到很多逆境胁迫,如干旱、水涝、冷害、盐渍等非生物胁迫以及病虫害等生物胁迫。这些逆境胁迫影响大豆生长发育的不同阶段,导致大豆的产量和品质降低。已有研究表明,miRNA参与调控植物逆境胁迫。Combiere等^[14]研究发现,miR169通

过调控其靶基因HAP2-1(hem activator protein 2-1)控制豆科植物根瘤发育适应低氮胁迫。Zeng等^[15]发现,大豆miR159a在磷胁迫诱导下水平上调,而miR166a、miR319a、miR396a、miR398b和miR1507a水平下调。李永光等^[16]通过对gma-miR1508a靶基因预测及功能分析发现,gma-miR1508a调控其靶基因参与低温胁迫进程。

miRNA1507家族是豆科植物特有的miRNA。gma-miR1507在大豆根、茎、叶和成熟种子中均有发现^[17]。Yan等^[18]研究发现,gma-miR1507的靶分子可能是一类NB-LRR(nucleotide binding leucine-rich repeat)的抗病基因。这些实验结果表明,gma-miR1507在植物体中可以通过调控靶mRNA发挥一定的功能,进而对植物的生长发育产生一定的影响。miRNA数据库miRBase(<http://www.mirbase.org/>)显示,大豆中的miRNA1507家族有3个成员,分别为gma-miR1507a、gma-miR1507b和gma-miR1507c。本文重点分析gma-miR1507a。利用生物信息学分析编码gma-miR1507a的基因序列和其基因启动子中的顺式作用元件,并预测相应的靶基因。通过人工构建miRNA技术,用gma-miR1507a和gma-miR1507a*分别替换at-miR319和at-miR319a*,将得到的amiR1507前体构建至植物表达载体pCAMBIA2301。利用农杆菌介导的方法将amiR1507a前体转入大豆子叶,得到转基因发状根,并利用stem-loop RT-PCR技术检测gma-miR1507a的水平,为进一步验证gma-miR1507a的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 数据库及生物信息学分析软件

在植物miRNA数据库PMRD(<http://bioinformatics.cau.edu.cn/PMRD/>)上搜索gma-miR1507a具体信息: gma-miR1507a的前体序列和成熟序列、前体基因起始位点上游1 500 bp的启动子序列以及miR1507家族基因。通过MEGA6.0软件构建了基于距离参数法(neighbor-joining, NJ)miR1507家族的系统进化树^[19]。

利用SoftBerry(<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>)的TSST在线工具预测gma-miR1507a上游启动子序列中可能存在的转录起始位点。进而通过PlantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)在线工具对gma-miR1507a上游启动子序列进行顺式作用元件分析。

在*psRNA*Target(<http://plantgrn.noble.org/psRNA/Target/?function=1>)上预测gma-miR1507a的靶基因,选择罚分小于3、靶基因可能性小于25的基因为目标靶基因。

1.2 胁迫处理下gma-miR1507a水平的检测

1.2.1 干旱处理 将大豆种子(Williams 82)种植在以蛭石为基质的塑料杯中,置于22~25 °C培养,正常浇水。待大豆生长到第1片三出复叶刚刚展开时,将大豆土壤浇透,第2 d停止供水。分别在停止供水0、1、3、5、7 d取样,取样部位为大豆的根。提取RNA,使用TaKaRa公司的PrimerScript反转录试剂盒和加茎环的gma-miR1507a-RT引物(表1)反转得到cDNA。使用Vazyme公司的AceQ qPCR SYBR Green Master Mix试剂盒进行荧光定量PCR实验,以*SnoR1*作为内参基因^[18]检测gma-miR1507a前体的水

平。

1.2.2 大豆疫霉菌处理 采用下胚轴创伤接种法接种大豆疫霉菌株P6497,将大豆种子(Williams 82)种植在以蛭石为基质的塑料杯中,置于22~25 °C培养。待大豆生长到2片真叶刚刚完全展开(1周左右),用消毒后的刀片在大豆子叶节下方1 cm处划出一道伤口,取培养5 d的菌丝块贴在伤口处。接种后的大豆幼苗于25 °C保湿培养,分别在接菌后0、3、6、12、24、36 h取下胚轴接种处上端1 cm做样品,提取RNA进行荧光定量PCR实验,检测gma-miR1507a前体的水平。

1.3 amiRNA1507a前体基因的克隆

以pRS300载体中拟南芥的miR319a的发夹环状前体结构作为模板,用overlap-PCR对at-miR319a和at-miR319a*进行替换^[20-21]。根据at-miR319a前体基因,在“WMD Oligo”(<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi?page=Oligo;project=stdwmd>)网站上设计出4条用于扩增amiR1507a的引物(I、II、III、IV)以及首尾的Primer A和Primer B。

进行两轮PCR扩增:第一轮PCR以pRS300为模板扩增出3条片段,对应的引物分别是:Primer A+IV、II+III、I+Primer B。第二轮PCR以第一轮的3条目的片段为模板,Primer A和Primer B为引物,扩增得到含amiR1507a的目的片段。利用限制性核酸内切酶*Kpn* I和*Sac* I分别对双元载体pCAMBIA2301(图1)和amiR1507a的前体基因进行双酶切和连接反应,得到重组质粒amiRNA1507a-pCAMBIA2301。将重组质粒于42 °C热激转化至大肠杆菌感受态细胞DH5 α 中,加入无抗的LB液体培养

表1 植物miR1507家族
Table 1 miR1507 family in plants

基因名称 Gene names	物种类型 Species	成熟序列(5'→3') Mature sequences (5'→3')
ahy-miR1507	<i>Arachis hypogaea</i>	CCU CGU UCC AUA CAU CAU CUA
gma-miR1507a	<i>Glycine max</i>	UCU CAU UCC AUA CAU CGU CUG A
gma-miR1507b	<i>Glycine max</i>	UCU CAU UCC AUA CAU CGU CUG
gma-miR1507c	<i>Glycine max</i>	CCU CAU UCC AAA CAU CAU CU
gso-miR1507a	<i>Glycine soja</i>	UCU CAU UCC AUA CAU CGU CUG A
gso-miR1507b	<i>Glycine soja</i>	UCU CAU UCC AUA CAU CGU CUG A
mtr-miR1507	<i>Medicago truncatula</i>	CCU CGU UCC AUA CAU CAU CUA G
vun-miR1507a	<i>Vigna unguiculata</i>	UCU CAU UCC AUA CAU CGU CUG A
lja-miR1507a	<i>Lotus japonicus</i>	UCU UCC AUC CAU ACA UCA UCU
lja-miR1507b	<i>Lotus japonicus</i>	UCU UCC AUC CAU ACA UCA UCU



LB/RB: 左右端边界区; *KanR*: 卡那霉素抗性基因; 35S: CaMV 35S启动子; NOS: 终止子; *GUS*: *GUS*报告基因。

LB/RB: left/right border; *KanR*: kanamycin resistance gene; 35S: CaMV 35S promoter; NOS: terminator; *GUS*: *GUS* reporter gene.

图1 植物表达载体amiRNA1507a-pCAMBIA2301结构示意图

Fig.1 Diagram of plant expression vector amiRNA1507a-pCAMBIA2301

基37 °C摇菌1 h, 然后涂板(抗卡那霉素的LB固体培养基), 于37 °C培养12 h, 挑取单菌落于37 °C、200 r/min摇菌得到菌液。PCR检测菌液中目的片段并测序。选取测序结果正确的菌液提取质粒, 得到的重组质粒即植物表达载体amiRNA1507a-pCAMBIA2301。然后, 将质粒电击转入发根农杆菌菌株K599中。加入无抗的YEP液体培养基于28 °C摇菌1 h, 然后涂板(抗卡那霉素和利福平的YEP固体培养基), 28 °C培养48 h, 挑取单菌落摇菌得到菌液。菌液PCR检测条带大小正确后, -80 °C保存甘油菌备用。

1.4 转基因大豆根毛的获得

挑选圆润饱满、种皮无破损的大豆种子(William 82), 氯气灭菌2 h, 在灭菌水中浸泡24 h后, 种在0.5%的琼脂培养基中, 萌发3~5 d。取萌发的大豆子叶, 用手术刀挖一小孔, 将 $D_{600}=0.6$ 的农杆菌菌液滴至小孔中, 放入含有羧苄青霉素和头孢霉素的White培养基中, 遮光暗培养3~4周。

配置GUS染料: 40 mg/mL的X-Gluc母液用GUS染色缓冲液稀释至0.5 mg/mL使用。取生长旺盛的大豆根毛的根尖, 用GUS染料于37 °C过夜染色, 初步鉴定amiRNA1507a表达载体是否转化成功。再取染色成功的根尖提取RNA, 荧光定量PCR检测gma-miR1507a前体的水平。

1.5 预测靶基因的表达

过表达gma-miR1507a的转基因发状根中对预测出的靶基因进行表达分析。提取过表达gma-miR1507a的转基因发状根的RNA, 荧光定量PCR检测预测靶基因的表达量。大豆*GmCons4*作为内参基因。

1.6 数据分析

每个实验组设置3次生物学重复, 利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对水平, 定量数据以“平均数±标准误差(mean±SE)”表示, 利用SPSS 17.0软件进行数据的显著性差异分析。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。使用GraphPad Prism 5软件绘制柱形图。

2 结果

2.1 gma-miR1507a序列及家族分析

根据PMRD上的信息, 得到gma-miR1507a二级茎环长度为107 bp, 成熟序列长22 nt(图2), 位于大豆13号染色体25849777-25849883[+]位置。gma-miR1507a是miR1507家族(表1)成员之一, 利用MEGA6.0构建了miR1507家族的系统进化树(图3)。

2.2 gma-miR1507a启动子顺式作用元件分析

对gma-miR1507a前体上游2 000 bp的序列进行分析, 在gma-miR1507a上游306 bp的位置预测到了1个转录起始位点。取该位点上游1 500 bp的序列在PlantCARE网站上进行顺式作用元件分析, 结果显示, gma-miR1507a的启动子区除了基本元件TATA-box和CAAT-box外, 还发现1个与植物逆境胁迫相关的MBS[MYB (v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog) binding site]元件, 即MYB结合位点; 1个与真菌诱导应答相关的Box-W1元件; 3个与胚乳表达相关的Skn-1-motif和1个与分生组织表达相关的CAT-box(图4)。

2.3 干旱及大豆疫霉对gma-miR1507a水平的影响

根据gma-miR1507a启动子区顺式作用元件的分析结果, 分别对大豆进行干旱和大豆疫霉菌处理, 检测gma-miR1507a的水平。结果显示, 当大豆受到干旱胁迫时, gma-miR1507a的水平在干旱后1 d发生显著下调, 在处理3、5、7 d时, gma-miR1507a几乎不表达(图5)。结果说明, gma-miR1507a可能参与大豆干旱胁迫。当受到大豆疫霉菌侵染时, gma-miR1507a水平呈现先升高后降低的趋势, 在侵染3 h显著升高, 之后逐渐降低, 在侵染12 h达到最低, 说明gma-miR1507a极有可能参与大豆与大豆疫霉菌的互作。

2.4 gma-miR1507a靶基因的预测

利用*psRNATarget*在线预测gma-miR1507a的靶基因, 共获得9个可能的靶基因(表2)。与拟南芥数据库比对发现, *Glyma01g214100*与拟南芥编码YTH(YT521-B

homology)家族蛋白质的*At4g11970*同源; *Glyma04g137800*同源拟南芥*At3g29765*基因, 是一类编码含HAT二聚体的TTF(transposases and transcription factors)类锌指蛋白的基因; *Glyma04g187600*与*AtMET1*(methyltransferase 1)同源; *Glyma05g001600*的同源基因*At2g48110*即拟南芥*RFR1*(reduce epidermal fluorescence 4-related 1)基因; *Glyma05g224700*和*Glyma08g031500*都与拟南芥*At4g32920*同源, 编码一类甘氨酸富集蛋白质; *Glyma08g037900*的拟南芥同源基因可以编码ROP(Rho-related GTPase from plant)蛋白; *Glyma09g257900*与拟南芥*AtBRM*(AtBRAHMA)同源; *Glyma19g260400*的拟南芥同源基因*At5g24470*是PRRs(pseudo-response regulators)家族的成员之一。

2.5 amiRNA1507a表达载体的构建

通过重叠PCR和琼脂糖凝胶电泳的方法, 用gma-miR1507a置换pRS300载体中拟南芥的miR319a, 回收条带得到amiRNA1507a的前体(图6)。酶切、连接至pCAMBIA2301上, 得到重组质粒amiRNA1507a-pCAMBIA2301。

2.6 转基因大豆根毛的获得

挑取测序正确的重组质粒, 农杆菌侵染大豆子叶, 并用White培养基进行组织培养。侵染约2 d后, 即可长出愈伤组织(图7A); 继续暗培养2~3周, 即可长出发状根(图7B), 此时, 可将发状根转入新的培养基中继续扩大培养(图7C)。

取生长旺盛的大豆根尖, 进行GUS染色。通过

染色结果初步鉴定amiRNA1507a已转入大豆根中。阳性根毛将被成功染成蓝色(图8A), 即代表目的基因amiRNA1507a过表达载体已成功导入根毛中。

为了进一步验证gma-miR1507a成功过表达, 取

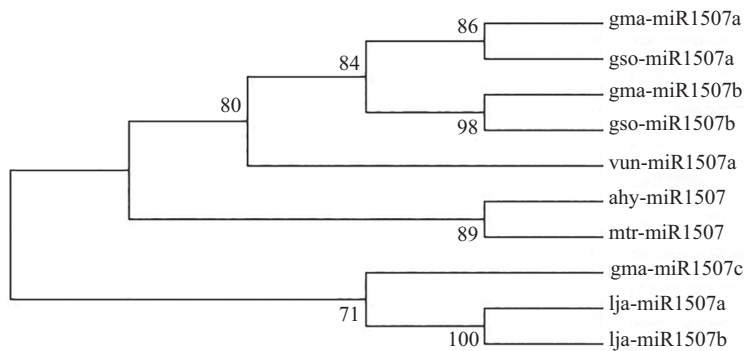


gma-miR1507a前体结构折叠形成一段发夹结构, 黑色方框表示gma-miR1507a的成熟序列。

The gma-miR1507a precursor forms a stem-loop structure. The black frame stands for the mature sequence.

图2 gma-miR1507a二级茎环结构

Fig.2 The stem-loop structure of gma-miR1507a precursor



gma-miR1507a、gma-miR1507b、gma-miR1507c来自大豆, gso-miR1507a、gso-miR1507b来自野生大豆, vun-miR1507a来自豇豆, ahy-miR1507来自花生, mtr-miR1507来自蒺藜苜蓿, lja-miR1507a、lja-miR1507b来自百脉根。

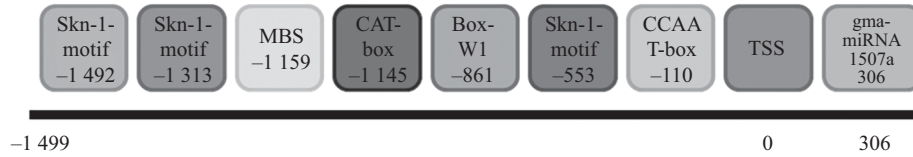
gma-miR1507a, gma-miR1507b and gma-miR1507c come from *Glycine max*, gso-miR1507a and gso-miR1507b are from *Glycine soja*, vun-miR1507a is from *Vigna unguiculata*, ahy-miR1507 comes from *Arachis hypogaea*, mtr-miR1507 is from *Medicago truncatula*, lja-miR1507a and lja-miR1507b are from *Lotus japonicas*.

图3 植物miR1507家族系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of plant miR1507 family

染成蓝色的根尖,使用stem-loop RT-PCR检测gma-miR1507a。结果显示, gma-miR1507a的水平与空载(empty vector, EV)相比,提高了近3倍,统计学分析表明差异极显著($P<0.01$, 图9)。

2.7 转基因发状根中预测靶基因的表达水平检测
通过qRT-PCR检测转基因发状根中预测的9个靶基因的表达水平发现, *Glyma01g214100*、*Glyma05g001600*、*Glyma05g224700*、*Glyma08g031500*、

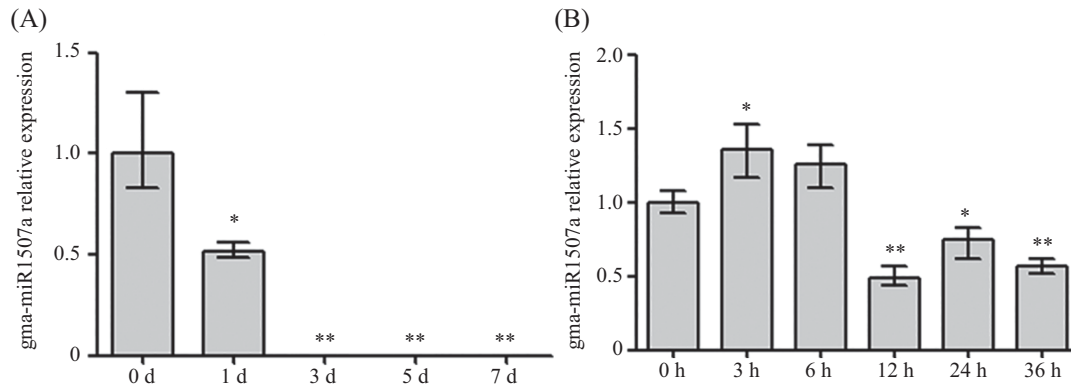


TSS: 转录起始位点; CCAAT-box: MYBHv1结合位点; Skn-1-motif: 与胚乳表达相关的顺式作用元件; Box-W1: 真菌诱导应答相关; CAT-box: 与分生组织表达相关; MBS: MYB的结合位点。

TSS: trancriptinal start site; CCAAT-box: MYBHv1 binding site; Skn-1-motif: cis-acting element required for endosperm expression; Box-W1: fungal elicitor responsive element; CAT: cis-acting element related to meristem expression; MBS: MYB binding site.

图4 gma-miR1507a启动子区域的部分顺式作用元件

Fig.4 Key cis-acting elements of the gma-miR1507a promoter



A: 干旱处理0、1、3、5、7 d时gma-miR1507a的水平; $*P<0.05$, $**P<0.01$, 与0 d组比较; B: 疫霉菌侵染0、3、6、12、24、36 h时gma-miR1507a的水平; $*P<0.05$, $**P<0.01$, 与0 h组比较。

A: the level of gma-miR1507a at 0, 1, 3, 5, 7 days under drought stress; $*P<0.05$, $**P<0.01$ vs 0 d group; B: the level at 0, 3, 6, 12, 24, 36 hours after inoculated with *Phytophthorasojae*; $*P<0.05$, $**P<0.01$ vs 0 h group.

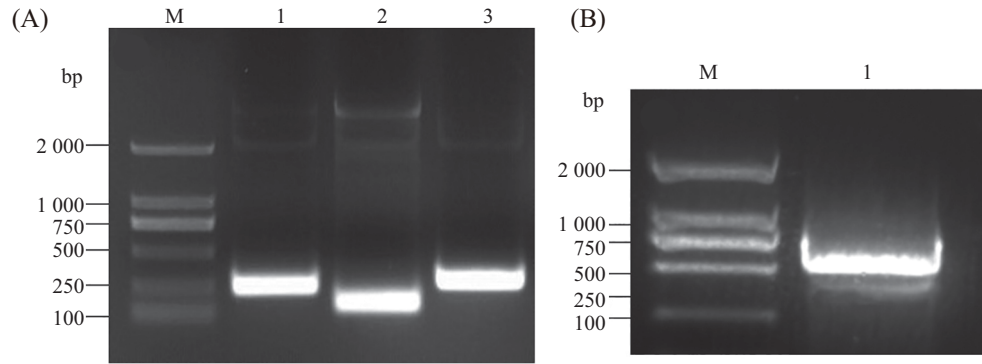
图5 不同处理下gma-miR1507a的水平

Fig.5 The level of gma-miR1507a under different stress

表2 预测gma-miR1507a靶基因

Table 2 The prediction targeting genes of gma-miR1507a

靶基因 Target gene	罚分 Expection	拟南芥同源基因 Homologous genes of <i>Arabidopsis</i>	核苷酸同源性(%) Nucleotide homology (%)	功能类型 Function
<i>Glyma01g214100</i>	3.0	<i>At4g11970</i>	82	YTH family protein
<i>Glyma04g137800</i>	2.0	<i>At3g29765</i>	95	TTF-type zinc finger protein with HAT dimerisation domain
<i>Glyma04g187600</i>	3.0	<i>At5g49160</i>	83	MET1
<i>Glyma05g001600</i>	2.0	<i>At2g48110</i>	81	RFR1
<i>Glyma05g224700</i>	3.0	<i>At4g32920</i>	80	Glycine-rich protein
<i>Glyma08g031500</i>	3.0	<i>At4g32920</i>	79	Glycine-rich protein
<i>Glyma08g037900</i>	3.0	<i>At1g52240</i>	79	ROP
<i>Glyma09g257900</i>	3.0	<i>At2g46020</i>	78	ATBRM
<i>Glyma19g260400</i>	3.0	<i>At5g24470</i>	83	PRR5

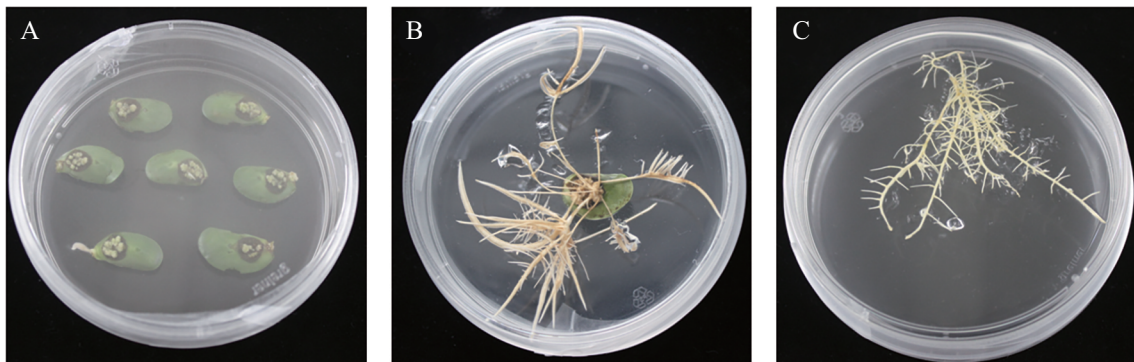


A: 第一轮扩增的凝胶电泳结果; M: DL2000 DNA marker; 1: Primer A+IV; 2: II+III; 3: Primer B+I; B: 第二轮扩增凝胶电泳结果; M: DL2000 DNA marker; 1: amiRNA1507a。

A: the result of the first PCR by gel electrophoresis; M: DL2000 DNA marker; 1: Primer A+IV; 2: II+III; 3: Primer B+I; B: the result of the second PCR by gel electrophoresis; M: DL2000 DNA marker; 1: amiRNA1507a.

图6 amiRNA1507a的前体条带的扩增

Fig.6 The band of amiRNA1507a precursor amplified by PCR

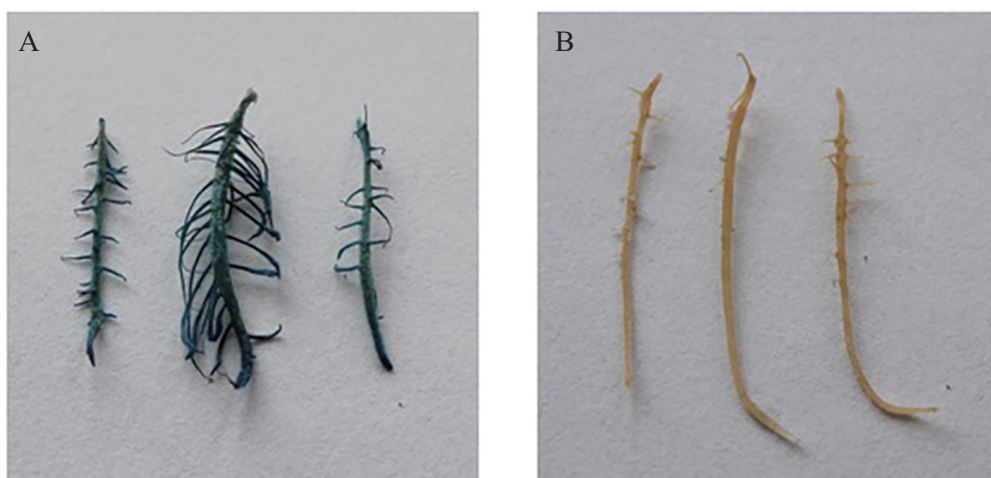


A: 用农杆菌侵染大豆子叶2 d后的形态; B: 图A的组织继续在暗光条件下培养2~3周; C: 转入新的培养基继续暗培养。

A: soybean cotyledon about 2 days after inoculation with *A. rhizogenes*; B: the tissue in picture A after 2-3 weeks in dark; C: hairy root in new medium in dark.

图7 发根农杆菌侵染大豆子叶生长过程

Fig.7 *Agrobacterium* mediated transformation of soybean cotyledon

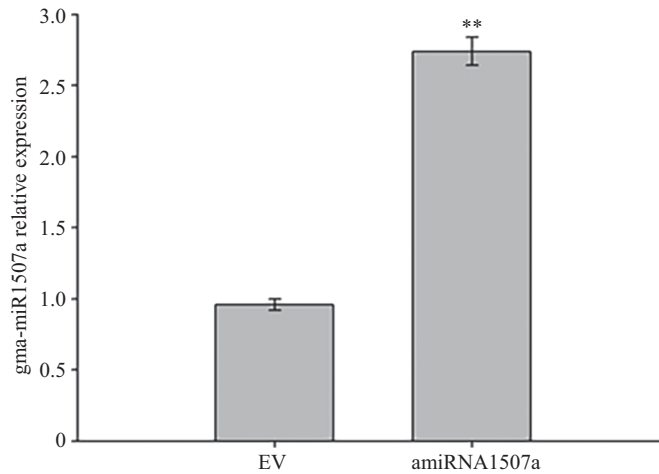


A: GUS染色成功的根尖; B: GUS染色未成功的根尖形态。

A: the root tip with GUS staining successfully; B: the root tip with GUS staining unsuccessfully.

图8 发状根根尖GUS染色结果图

Fig.8 Histochemical GUS staining of soybean hairy roots

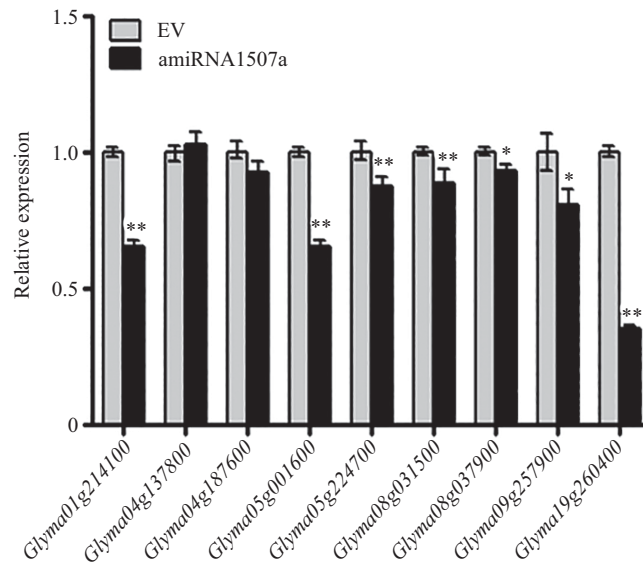


用*SnoR1*基因作为内参。** $P < 0.01$, 与EV组比较。

Using *SnoR1* as the reference gene. ** $P < 0.01$ vs EV group.

图9 gma-miR1507a在发状根中的表达

Fig.9 The expression level of gma-miR1507a in soybean hairy roots



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与EV组比较。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs EV group.

图10 在转基因发状根中预测靶基因表达水平

Fig.10 The expression level of predicted target genes in transgenic hairy roots

Glyma08g037900、*Glyma09g57900*、*Glyma19g260400* 共7个靶基因在转基因发状根中的表达水平相比于对照明显下调, 其中5个达到极显著水平(图10)。结果表明, 这些基因可能是gma-miR1507a的靶基因, 受到gma-miR1507a的调控。

3 讨论

本文通过生物信息学的方法对gma-miR1507a及其进化树进行分析, 可以看出miRNA1507是豆科植物特有的一类miRNA, 大豆的miRNA1507a与野

生大豆(*Glycine soja*)、豇豆(*Vigna unguiculata*)在同一个大分支上。结果说明, gma-miR1507a、gso-miR1507a和vun-miR1507a的亲缘关系较近。

在对gma-miR1507a前体的转录起始位点上游的启动子元件进行分析时, 发现了一些与逆境胁迫、病菌侵染和光反应相关的元件。这些元件的存在说明gma-miR1507a极有可能参与对逆境胁迫、病菌侵染和光反应的调控过程。例如, 启动子区的MBS元件是MYB的结合位点, 有研究表明, 拟南芥*rd22*(responsive to dehydration 22)基因启动子区的

MYB结合位点,在干旱胁迫下,可以作为转录调控因子参与ABA(abscisic acid)诱导的*rd22*基因的表达^[22]。当植物受到病原菌侵染时,启动子区的Box-W1元件可以调控局部基因的表达^[23]。本文在对干旱胁迫和疫霉菌侵染下gma-miR1507a水平的检测也证明,其可能参与了大豆抗旱和病菌侵染的进程。至于gma-miR1507a具体如何发挥调控作用还需进一步的实验验证。

我们对gma-miR1507a的靶基因进行预测,并通过同源比对的方法对靶基因进行功能注释。结果发现,与预测的靶基因*Glyma01g214100*同源的*At4g11970*基因编码YTH家族蛋白质,Li等^[24]发现,YTH家族蛋白质是一类新的RBPs(RNA-binding proteins),可以在拟南芥和水稻中响应生物和非生物胁迫以及激素应答。*Glyma05g001600*的同源基因*At2g48110*即拟南芥*RFR1*基因可以参与木质素的新陈代谢过程^[25]。与靶基因*Glyma04g187600*同源的拟南芥*AtMET1*会影响植物的株高和开花时间^[26-27]。*Glyma08g037900*的拟南芥同源基因*At1g52240*编码ROP蛋白质,ROP是小GTP结合蛋白超家族成员,在植物中起着信号开关的作用^[28]。*Glyma09g257900*的拟南芥同源基因*AtBRM*可以与*AtSWI(AtSWITCH)*相互作用,抑制叶片中种子成熟基因的表达^[29],还可以对植物根和花的生长发育发挥调控作用^[30-31]。*Glyma19g260400*与拟南芥*PRR5(pseudo-response regulator 5)*同源,*PRR5*是*PRRs*基因家族的成员,是植物生物钟中央振荡器的中心组分,与光调节相关,调控生物节律^[32]。通过在转基因发状根中检测靶基因的表达情况,初步验证*Glyma01g214100*、*Glyma05g001600*、*Glyma05g224700*、*Glyma08g031500*、*Glyma08g037900*、*Glyma09g57900*、*Glyma19g260400*靶基因受到gma-miR1507a的负调控。本研究结果提示,gma-miR1507a可能通过调控这些靶基因调控上述反应,进而参与调控逆境胁迫。

通过启动子顺式作用元件分析发现,gma-miR1507a前体上游启动子区域存在多个与逆境相关的顺式作用元件;利用*psRNATarget*预测到9个靶基因,同源比对结果显示,部分参与逆境和抗病进程;以拟南芥miR319a的前体结构为框架,构建amiRNA1507a表达载体,获得过表达发状根;利用stem-loop RT-PCR检测gma-miR1507a的表达,发现其显著提高。以上结果说明,amiRNA1507a表达载

体可以用于gma-miR1507a生物学功能的研究。

参考文献 (References)

- 1 Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75(7): 853-4.
- 2 Sunkar R, Zhu JK. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2004; 16(8): 2001-19.
- 3 Sunkar R, Girke T, Jain PK, Zhu JK. Cloning and characterization of microRNAs from rice. *Plant Cell* 2005; 17(5): 1397-411.
- 4 Yao Y, Guo G, Ni Z, Sunkar R, Du JK, Zhu JK, et al. Cloning and characterization of microRNAs from wheat (*Triticum aestivum* L). *Genome Biol* 2007; 8(6): R96.
- 5 王 维, 张玉娟, 陈 洁, 刘聚波, 夏民旋, 沈法富. 植物逆境胁迫相关miRNA研究进展. *生物技术通报*(Wang Wei, Zhang Yujuan, Chen Jie, Liu Jubo, Xia Minxuan, Shen Fafu. Research progress of microRNAs in plant stress responses. *Biotechnology Bulletin* 2015; 31(1): 1-10.
- 6 Baumberger N, Baulcombe DC. *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(33): 11928-33.
- 7 Liu J, Cheng XL, Liu D, Xu WH, Wise R, ShenQH. The miR9863 family regulates distinct Mla Alleles in barley to attenuate NLR receptor-triggered disease resistance and cell-death signaling. *PLoS Genet* 2014; 10(12): e1004755.
- 8 Llave C, Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC. Cleavage of scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science* 2002; 297(5587): 2053-6.
- 9 Tang G, Reinhart BJ, Bartel DP, Zamore PD. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev* 2003; 17(1): 49-63.
- 10 Chen XM. MicroRNA biogenesis and function in plants. *FEBS Lett* 2005; 579(26): 5923-31.
- 11 Zhang BH, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. Plant microRNA: A small regulatory molecule with big impact. *Dev Biol* 2006; 289(1): 3-16.
- 12 Yin XC, Wang J, Cheng H, Cheng H, Wang XL, Yu DY. Detection and evolutionary analysis of soybean miRNAs responsive to soybean mosaic virus. *Planta* 2013; 237(5): 1213-25.
- 13 余永亮, 梁慧珍, 王树峰, 练 云, 位艳丽, 王庭峰. 中国转基因大豆的研究进展及其产业化. *大豆科学*(Yu Yongliang, Liang Huizhen, Wang Shufeng, Lian Yun, Wei Yanli, Wang Tingfeng. Research progress and commercialization on transgenic soybean in China. *Soybean Science*) 2010; 29(1): 143-9.
- 14 Combiér JP, Frugier F, de Billy F, Boualem A, El-Yahyaoui F, Moreau S, et al. MtHAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*. *Genes Dev* 2006; 20(22): 3084-8.
- 15 Zeng HQ, Zhu YY, Huang SQ, Yang ZM. Analysis of phosphorus-deficient responsive miRNAs and cis-elements from soybean (*Glycine max* L). *J Plant Physiol* 2010; 167(15): 1289-97.
- 16 李光永, 艾 佳, 王 涛, 金龙国, 邱丽娟, 李文滨. 大豆gma-miR1508a靶基因预测及功能分析. *大豆科学*(Li Guagnyong,

- Ai Jia, Wang Tao, Jin Longguo, Qiu Lijuan, Li Wenbin. The Target genes prediction and analysis of gma-miR1508a. *Soybean Science* 2014; 33(4): 480-2.
- 17 Li H, Deng Y, Wu TL, Subramanian S, Yu O. Misexpression of miR482, miR1512, and miR1515 increases soybean nodulation. *Plant Physiol* 2010; 153(4): 1759-70.
- 18 Yan Z, Md SH, Oswaldo VL, Hoang NT, Zhai JX, Wang J, *et al.* Identification and functional characterization of soybean root hair microRNAs expressed in response to *Bradyrhizobium japonicum* infection. *Plant Biotechnol J* 2016; 14(1): 332-41.
- 19 王艳芳, 赵彦宏, 张萍, 周瑞莲. 大豆miR-171基因家族的进化与功能分析. *植物遗传资源学报*(Wang YF, Zhao YH, Zhang P, Zhou RL. Molecular evolution and targets prediction of gma-miR171 gene family in soybean. *Journal of Plant Genetic Resources*) 2015; 16(5): 1089-92.
- 20 Schwab R, Ossowski S, Riester M, Warthmann N, Weigel D. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2006; 18(5): 1121-33.
- 21 倪志勇, 于月华, 陈全家, 曲延英. 大豆gma-miR1514b生物信息学分析及人工microRNA植物表达载体构建. *大豆科学*(Ni Zhiyong, Yu Yuehua, Chen Quanjia, Qu Yanying. Bioinformatic analysis of gma-miR1514b and construction of its artificial miRNA plant expression vectors. *Soybean Science*) 2016; 35(1): 46-51.
- 22 Hiroshi A, Takeshi U, Takuya I, Motoaki S, Kazuo S, Kazuko YS. *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* 2003; 15(1): 63-78.
- 23 Rushton PJ, Reinstädler A, Lipka V, Lippok B, Somssich IE. Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound-induced signaling. *Plant Cell* 2002; 14(4): 749-62.
- 24 Li DY, Zhang HJ, Hong YB, Huang L, Li XH, Zhang YF, *et al.* Genome-wide identification, biochemical characterization, and expression analyses of the YTH domain-containing RNA-binding protein family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Mol Biol Report* 2014; 32(6): 1169-86.
- 25 Bonawitz, ND, Kim JI, Tobimatsu Y, Ciesielski PN, Anderson NA, *et al.* Disruption of mediator rescues the stunted growth of a lignin-deficient *Arabidopsis* mutant. *Nature* 2014; 509(7500): 376-9.
- 26 Apashkin VV, Kutueva LI, Vaniushin BF. Is the cytosine DNA methyltransferase gene MET1 regulated by DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* plants. *Russ J Genet* 2011; 47(3): 320-31.
- 27 Kankel MW, Ramsey DE, Stokes TL, Flowers SK, Haag JR, Jeddloh JA, *et al.* *Arabidopsis* MET1 cytosine methyltransferase mutants. *Genetics* 2003; 163(3): 1109-22.
- 28 Zheng ZL, Yang ZB. The Rop GTPase: An emerging signaling switch in plants. *Plant Mol Biol* 2000; 44(1): 1-9.
- 29 Farrona S. The *Arabidopsis thaliana* SNF2 homolog AtBRMc controls shoot development and flowering. *Development* 2004; 131(20): 4965-75.
- 30 Tang X, Hou AF, Babu M, Nguyen V, Hurtado L, Lu Q, *et al.* The *Arabidopsis* BRAHMA chromatin-remodeling ATPase is involved in repression of seed maturation genes in leaves. *Plant Physiol* 2008; 147(3): 1143-57.
- 31 高燕, 杨松光, 崔玉海, 吴克强. 拟南芥染色质重塑因子AtBRM和AtSWI3C基因的克隆及生物信息学分析. *广东农业科学*(Gao Yan, Yang Songguang, Cui Yuhai, Wu Keqiang. Molecular cloning and bioinformatic analysis of the *Arabidopsis thaliana* chromatin-remodeling factors AtBRM and AtSWI3C. *Guangdong Agricultural Sciences*) 2012; 14: 131-5.
- 32 Matsushika A, Makino S, Kojima M, Mizuno T. Circadian waves of expression of the APRR1/TOC1 family of pseudo response regulators in *Arabidopsis thaliana*: Insight into the plant circadian clock. *Plant Cell Physiol* 2000; 41(9): 1002-12.