

利用水稻原生质体快速分析 miRNA 靶标 RNA

郭萍^{1,2}, 武瑶¹, 李嘉^{1,3}, 方荣祥¹, 贾燕涛¹

1 中国科学院微生物研究所 植物基因组学国家重点实验室, 北京 100101

2 中国科学院大学, 北京 100049

3 北京城市学院, 北京 100083

郭萍, 武瑶, 李嘉, 等. 利用水稻原生质体快速分析 miRNA 靶标 RNA. 生物工程学报, 2014, 30(11): 1751-1762.

Guo P, Wu Y, Li J, et al. Efficient transient expression to analyze miRNA targets in rice protoplasts. Chin J Biotech, 2014, 30(11): 1751-1762.

摘 要: 与转基因方法相比, 基因瞬时表达系统在基因表达研究上具有快速便捷的特点。为检验水稻 miRNA 与靶标基因之间的调控关系, 将 *MIRNA* 基因与 *GFP* /靶标序列融合基因 (或 *GFP* /靶标突变序列融合基因) 构建在同一瞬时表达载体上, 并转化水稻原生质体, 通过观察含有 *GFP* /靶标序列融合基因和 *GFP* /靶标突变序列融合基因的载体之间的荧光强度差异, 以及通过 qRT-PCR 方法检测靶标和非靶标 mRNA 水平差异来验证 miRNA 对靶标基因的调控。用 *osaMIR156* 和 *osaMIR397* 及其靶标序列对实验设计方法进行验证, 荧光显微镜观察和 qRT-PCR 检测证明, *osamiR156* 和 *osamiR397* 能降低相应靶标序列 *GFP* 融合基因的转录物水平和 GFP 荧光水平。此种水稻原生质体瞬时表达方法用于在体内进行大规模 miRNA 靶标基因检测。由于其他近缘单子叶植物很可能与水稻有近似的小 RNA 加工系统, 因此对于其他单子叶植物 miRNA 功能研究也将有很好的应用前景。

关键词: miRNA 靶标, 水稻原生质体, 体内荧光检测

Received: February 17, 2014; **Accepted:** April 8, 2014

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2011CB100703), National Natural Science Foundation of China (Nos. 31370161, 31030008).

Corresponding author: Yantao Jia. Tel: +86-10-64861838; Fax: +86-10-64858245; E-mail: jiayt@im.ac.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2011CB100703), 国家自然科学基金 (Nos. 31370161, 31030008) 资助。

网络出版时间: 2014-05-13

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.140081.html>

Efficient transient expression to analyze miRNA targets in rice protoplasts

Ping Guo^{1,2}, Yao Wu¹, Jia Li^{1,3}, Rongxiang Fang¹, and Yantao Jia¹

¹ State Key Laboratory of Plant Genomics, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

³ Beijing City University, Beijing 100083, China

Abstract: Compared with the transgenic approach, transient assays provide a convenient alternative to analyze gene expression. To analyze the relationship between miRNAs and their target genes, a rice protoplast system to detect target gene activity was established. The *MIRNA* and *GFP*-fused target sequence (or *GFP*-fused mutated sequence as a non-target control) were constructed into the same plasmid, and then delivered into rice protoplasts. The *GFP* expression level decreased significantly when the protoplasts were transfected with the plasmid containing *GFP*-fused target compared to that of the plasmid with non-target sequence either by fluorescence microscopy or qRT-PCR method. Two microRNA genes, *osaMIR156* and *osaMIR397*, and their target sequences were used to prove the feasibility of the rice protoplast transient assay system. This method will facilitate large-scale screening of rice miRNA target *in vivo*, and may be suitable for functional analysis of miRNAs of other monocot plants that might share the evolutionarily conserved small RNA processing system with rice.

Keywords: miRNA target, rice protoplast, *in vivo* fluorescence assay

越来越多的证据表明, 非编码小RNA (Non-coding small RNA) 广泛存在于动物、植物及微生物中, 作为一类新层次上的基因表达调控物质对生物的生长发育等多种生理过程具有重要作用。植物内源非编码小RNA主要分为 miRNAs (MicroRNAs) 和 siRNA (Short interfering RNAs), siRNA 又分为反义转录物 siRNA (Natural antisense transcript siRNA, nat-siRNA)、反式作用 siRNA (Trans-acting short interfering RNAs, tasiRNAs)、异染色质 siRNA (Heterochromatic siRNAs) 和长 siRNA (Long siRNA, lsiRNA) 等。它们可以通过对靶标 mRNA 的剪切或翻译抑制, 以及对 DNA 或染色体的甲基化等方式调控靶标基因的表达^[1]。非编码小RNA像可变电阻一样, 能够精细调控众多基因的表达水平, 对生物体的生长发育和功能

至关重要。基因芯片分析发现, 在高等真核生物中受 miRNAs 调控的基因就多达 50%^[2]。

MicroRNAs 是一种约 21–23 个碱基的单链小分子 RNA, 是由具有发夹结构的约 70–90 个碱基大小的单链 RNA 前体经过 Dicer 酶加工而成。在秀丽线虫中 miRNA *lin-4* 和 *let-7* 被首次发现, 随后在包括人类、果蝇、植物等多种生物物种中鉴定出数百个 miRNAs^[3–4]。成熟的 miRNAs 进入 RNA 诱导的沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC), 并作用于靶标 RNA 的特定靶位点, 这些靶位点通常位于 mRNA 的 3'-UTR 区 (Untranslated region) 或 CDS 区 (Coding regions), 引起靶标 RNA 的剪切或者翻译抑制^[5]。一个 miRNA 与靶标基因只需要部分序列匹配就能完成两者之间的识别, 这种 miRNA 与靶标基因的匹配程度的可变性, 使得

一个miRNA可能与多个靶标互作, 而一个靶标也可能与多个miRNA互作。植物中保守的miRNA, 其不同物种之间的靶标基因也常存在保守性; 但不同物种中也存在特异的、非保守的miRNA靶标序列^[5]。目前, 挖掘miRNA新靶标的方法主要是通过生物信息学预测和生物学实验获得。由于miRNA与靶标序列为不完全匹配, 这对miRNA靶标预测的准确性构成很大挑战; 而基因克隆、基因芯片和深度测序等方法对发现低丰度和不同时空表达的靶标基因有一定困难。如果利用计算机预测结合实验验证的方法, 两者取长补短, 将大大加速研究进程。

当miRNA进入RISC复合物, 复合物核心成分AGO 蛋白 (Argonaute proteins) 行使对靶标RNA的切割功能。AGO蛋白在距离miRNA 5'端第10–11位核苷酸相应位置对靶RNA链进行精确切割, 产生5'磷酸和3'羟基的切割产物, 这一特性被用于检测mRNA是否为miRNA的靶标^[6]。常用的检验miRNA靶基因的方法有农杆菌注射法和5'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 法。农杆菌注射法是将含有miRNA及靶基因载体的农杆菌注射接种植物叶片, 检测miRNA对靶基因的剪切效果^[6]; 5'RACE法是直接分析miRNA剪切的产物, 把接头连接到miRNA剪切产物的5'末端, 经RT-PCR和测序, 精确鉴定miRNA的切割位点^[6], 也是目前miRNA靶基因鉴定中最广泛采用的方法。农杆菌注射法鉴定miRNA靶基因与通过转基因植物鉴定方法相比, 因其具有简单、快速的特点而在双子叶植物中得到广泛应用。水稻等单子叶植物以农杆菌注射法成功鉴定miRNA靶基因尚未见到相关报道。

本实验中将花椰菜花叶病毒 (CaMV) 35S

启动子驱动的内源 miRNA 序列, 与 35S 启动子驱动的 3'末端融合 miRNA 靶标序列 (或 miRNA 靶标变异序列) 的 *GFP* 基因串联到 pBI221 载体, 以 PEG (聚乙二醇) 法转化水稻原生质体, 通过 GFP 荧光强度比较发现, 含有 miRNA 靶标序列载体与含 miRNA 靶标变异序列载体存在差异, 说明 miRNA 能够有效识别并干扰 RNA 靶标基因的表达, Real-time PCR 实验验证了该结果。该方法是一种快速有效验证 miRNA 的靶标的方法, 对于研究水稻 miRNA 的功能具有实用意义。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒、培养基及植物材料培养

大肠杆菌 DH5 α 、BL21 (DH3) 菌株为本实验室收藏。用于基因瞬时表达的 pBI221-eGFP、pCAMBIA1300 质粒为本实验室收藏。常规 LB 培养基配制参见文献[7]。水稻日本晴 (*Oryza sativa* L. var. Nipponbare) 种子浸水萌发后播种于土中 (蛭石 泥炭土=1 1), 光照培养 (光/暗周期为 16 h/8 h)。

1.2 主要试剂和仪器

各种限制性内切酶、T4 DNA连接酶、T载体和质粒提取试剂盒购自Promega公司; 无缝克隆试剂盒购自GenBank Biosciences公司; TRIzol 试剂、逆转录酶购自Invitrogen公司; poly(A)聚合酶和 FirstChoice[®] RLM-RACE 试剂盒购自 Ambion公司; 纤维素酶R-10和离析酶R-10购自日本 Yakult 公司; 实时定量PCR 试剂盒购自 TOYOBO公司。Ambion PCR引物由Invitrogen 公司合成。实时定量qPCR使用BioRad C1000荧光定量PCR仪, 荧光观察所用仪器为徕卡公司激光共聚焦显微镜 (型号Leica SP8)。

表1 本文所用的引物

Table 1 Primers used in this work

Primer name	Primer sequence (5'-3')
Ter-F	ATGACCATGATTACGATTCCCGATCTAGTA
35S-R	CGACGGCCAGTGCCAGCTTGCAT
PML-R	GAGAACACGGGGGACTCACGTGCAG
PML-F	GGGAAATTCGAGCTGCACGTGAGTC
BLG159-F	CGCATATGAAGCTTGCATGCCTGCAGGT
BLG159-R	CTGACGTCTACCATGATTACGAATTCCC
156-F	GGGAATGATGTAGCACGG
156-R	TCAGGAATTACGAAGGGTG
BI156-F	GAACACGGGGGACTCACGGGAATGATGTAGCACGG
BI156-R	GAAATTCGAGCTGCACTCAGGAATTACGAAGGGTG
MGFP-F	GAACACGGGGGACTCTAGAG
spl-R-2	GGGAAATTCGAGCTCATGACAGAAGAGAGAGACACAGCTCGAGTAAGATCT TCCGGACTTGTACA
splm-R-2	GGGGAAATTCGAGCTCAGGAGAGCAGGGACAGGGCGCAGCTCGAGTAAGAT CTTCCGGACTTGTACA
397-F	TCCAGAGCGCACACTATT
397-R	TGAGTTGCTGCATTGTTGT
BI397-F	GAACACGGGGGACTCACTCCAGAGCGCACACTATT
BI397-R	GAAATTCGAGCTGCACTGAGTTGCTGCATTGTTGT
lac-R	GGGGAAATTCGAGCTCTAGTTGAGTGCAGCGTTGATGAGCCTCAGCATGTAA GATCTTCCGGACTTGTAC
lacm-R	GGGGAAATTCGAGCTCTAGTTTAAAGCTGCATTTATCAGTCTCAGCATGTAA GATCTTCCGGACTTGTAC
Poly(T) adapter	GCGAGCACAGAATTAATACGACTCACTATAGG(T)12VN
RP	GCGAGCACAGAATTAATACGAC
gfpqrt	ACGAGCTGTACAAGTCCGG
miR156-F	TGACAGAAGAGAGTGAGCAC
miR397-F	TCATTGAGTGCAGCGTTGATG
actin-F	TGTATGCCAGTGGTCGTACCA
actin-R	CCAGCAAGGTCGAGACGAA

1.3 质粒的构建

对 pBI221-eGFP 质粒进行改造, 将 35S 启动子分别驱动的 miRNA 基因和 3'端融合相应 miRNA 靶标序列的 GFP 基因构建到同一载体上。首先用 Ter-F 和 PML-R, 35S-R 和 PML-F 为引物, 以 pCAMBIA1300-221 质粒 (pBI221 经 *Hind* III 和 *Eco*R I 酶切的小片段插入

pCAMBIA1300 的 *Hind* III/*Eco*R I 位点) 为模板, 扩增 Nos-T 终止子和 35S 启动子片段, 将两个 PCR 片段和经 *Eco*R I/*Hind* III 酶切的 pCAMBIA1300 载体大片段进行无缝连接, 得到质粒 pCAMBIA-PML, 使 pCAMBIA1300-221 质粒中删除 GUS 基因, 同时添加 *Pml* I 酶切位点。用 BLG159F/R 引物, 以质粒 pCAMBIA-PML

为模板进行 PCR 扩增,使 35S 启动子 5'端和终止子 3'端加上 *Aat* II 和 *Nde* I 的酶切位点,并克隆到 T 载体,得到质粒 T-PML。T-PML 经 *Aat* II 和 *Nde* I 酶切片段插入 pBI221-eGFP 载体 *Aat* II/*Nde* I 酶切位点,得到本实验用的载体 pBI221-PML。

从 miRBase 数据库中检索到水稻 *osaMIR156* 的序列信息 (<http://www.mirbase.org>),用 156F/R 引物从水稻基因组中扩增 *osaMIR156* 的全长基因,以此 PCR 产物为模板,用 BI156F/R 引物再次扩增,使 PCR 片段加入 15 bp 的 pBI221-PML 载体序列,回收 PCR 产物与 pBI221-PML 的 *Pml* I 酶切大片段无缝连接,得到 pBI156 载体。

以 pBI221-eGFP 质粒为模板,用引物 MGFP-F 和含有 *osamiR156* 靶标序列的引物 spl-R-2 进行 PCR 扩增,去除 *GFP* 的 ORF 终止密码子,并使其 3'端融合靶标序列得到 GFPspl,回收 GFPspl 片段并与 pBI156 的 *Bam*HI/*Sac*I 酶切产物进行无缝连接,得到 pBI156spl 载体。同样的,用引物 MGFP-F 和 splm-R-2 扩增得到 *GFP* 和突变靶标基因序列融合序列,即 GFPsplm,将其与 pBI156 的 *Bam*HI/*Sac*I 酶切产物进行无缝连接,得到 pBI156splm 载体。

与上述构建方法相似,用 397F/R 引物扩增出 *osaMIR397* 基因的全长序列,再用 BI397F/R 引物使扩增片段延长后与 pBI221-PML 的 *Pml* I 酶切产物无缝连接,得到 pBI397 载体。

以 pBI221-eGFP 质粒为模板,用 MGFP-F 和 lac-R 引物扩增,将 *osamiR397* 靶标序列与 *GFP* 融合,得到 GFPlac 片段,MGFP-F 和 lacm-R 引物扩增,将 *osamiR397* 靶标突变序列与 *GFP* 融合,得到 GFPlacm 片段;回收这两个片段,分别与 pBI397 载体的 *Bam*HI/*Sac*I 酶切产物

进行无缝连接,得到载体 pBI397lac 和 pBI397lacm。

1.4 原生质体的制备

采取酶解的方法制备原生质体^[8]。取生长约 18 d 的日本晴水稻小苗的茎部,用刀片切成 0.5 mm 细圆片;将圆片移入 10 mL 酶解液中,酶解液主要成分为 1.5%纤维素酶 R-10,0.75%离析酶 R-10,0.4 mmol/L D-甘露醇,20 mmol/L KCl,20 mmol/L MES [2-(N-吗啉)乙烷磺酸,pH 5.7],10 mmol/L CaCl₂,5 mmol/L β-巯基乙醇,0.1%BSA;过滤除菌,加入羧苄青霉素至终浓度 50 μg/mL,28 °C,50 r/min 避光振荡消化 4 h;过滤网(200 目)过滤酶解液,以 50 mL 的离心管收集液体,150 r/min,5 min 离心沉淀原生质体(设置最低的加速度);移除上清液,加入 W5 缓冲液 [154 mmol/L NaCl,125 mmol/L CaCl₂,5 mmol/L KCl,2 mmol/L MES,pH 5.7],轻轻颠倒试管洗涤沉淀,150 r/min 离心 5 min 沉淀原生质体,弃上清液。

1.5 原生质体的转化

将制备的原生质体用 MMg 溶液(4 mmol/L MES,0.6 mol/L 甘露醇,15 mmol/L MgCl₂)重悬至原生质体的终浓度约为 10⁶ 个/mL。100 μL 原生质体中加入质粒载体约 20 μg,混匀后加入 110 μL 40% PEG 溶液(0.6 mol/L 甘露醇,100 mmol/L CaCl₂,40% V/V PEG4000)溶液,混匀后于 28 °C 孵育 15 min,加入 2 mL W5 缓冲液,颠倒混匀;150 r/min 离心 3 min,离心沉淀原生质体,弃上清;用 500 μL W5 缓冲液重悬原生质体,28 °C 避光静置过夜。

1.6 GFP 荧光显微观察

原生质体经质粒转化 10–12 h,利用激光共聚焦显微镜进行观察并统计荧光强度。将 500 μL 原生质体最小加速度 150 r/min 离心

3 min, 吸取并弃掉 450 μ L 上清, 重悬原生质体, 每次吸取 10 μ L 原生质体悬液进行显微观察, 用 10 \times 物镜 (数值孔径 NA 为 0.4) 观察, 多线氩离子激光器激发, 激光能量 20%, 激发波长为 488 nm, 发射波长为 500–600 nm; 光电倍增管检测器检测荧光信号, 增益值 800; 图像扫描密度 1 024 \times 1 024, 扫描速度 200 Hz。利用 LAS AF Lite 软件统计每个视野荧光通道的平均灰度值 [(灰度值总和–背景灰度值)/计入测量的像素数], 作为表征视野内发光细胞荧光强度的一个参数, 将其除以原生质体细胞总数, 得到原生质体细胞的平均相对荧光强度。

1.7 RNA 的提取和实时定量 PCR 分析

原生质体经质粒转化后 8–10 h, 150 r/min 离心 3 min, 吸取并弃掉 450 μ L 上清, 加入 500 μ L TRIzol, 混匀室温静置 5 min, 加入 100 μ L 三氯甲烷, 混匀室温静置 5 min, 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 15 min; 吸取 300 μ L 上清加入 250 μ L 异丙醇和 1 μ L 糖原, –20 $^{\circ}$ C 沉淀过夜; 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 45 min 沉淀 RNA, 70% 的酒精清洗沉淀, 离心 5 min, 弃上清, 室温晾干 5 min, 用适量无 RNase 水溶解沉淀。

RNA 的加尾和逆转录操作参考 Shi 等工作并稍做改动^[9]。取 1 μ g 的总 RNA 经 DNase I 消化后, 在逆转录酶的工作缓冲液中加入 poly(A)聚合酶和 ATP, 37 $^{\circ}$ C 反应 1 h, 使 RNA 3' 端加上 poly(A)尾巴; 65 $^{\circ}$ C 5 min, 待反应产物降至室温, 加逆转录酶 (SuperScript™ II Reverse Transcriptase) 和 0.5 μ g poly(T) adapter (3'RACE adapter in FirstChoice® RLM-RACE kit) 进行逆转录反应。

以上述逆转录产物为模板进行 qPCR 定量, osamiR156 的 PCR 扩增引物为 miR156-F 和 RP,

PCR 产物大小 64 bp; osamiR397 扩增引物为 miR397-F 和 RP, PCR 产物大小 65 bp; *GFP* 基因扩增引物为 gfpqrt 和 RP。使用 TOYOBO SYBR Green (Realtime PCR Master mix) 试剂盒: 20 μ L 体系中加入 0.5 μ L cDNA 模板, 1 mmol/L 正向引物, 1 mmol/L 反向引物。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 40 个循环反应。

2 结果

2.1 瞬时表达载体的构建

为在水稻原生质体中检测 miRNA 是否能够剪切其靶标基因, 我们采取了将 miRNA 基因和靶标基因串联表达在同一个植物表达载体中的策略, 两者均由 35S 启动子驱动。为了便于观察 miRNA 对靶标基因的作用效果, 我们将与 miRNA 互补配对的含有靶标基因序列与去除终止密码子的 *GFP* 基因 3'端融合, 如果 miRNA 能够剪切靶标 mRNA, 则与靶标重组的 *GFP* (称为 *GFPc* 基因) 也能被剪切。同时突变靶标基因序列, 在不改变其氨基酸序列的前提下使之不与 miRNA 互补配对, 再与 *GFP* 基因序列融合重组成不可被剪切的 *GFPnc* 基因, 作为 *GFPc* 基因的对照。将 *GFPc* 基因和 *GFPnc* 基因分别同相应的 miRNA 共同在水稻原生质体中瞬时表达, 通过比较 *GFPc* 基因和 *GFPnc* 基因的表达水平, 判断特定 miRNA 和其候选靶标基因的调控关系。本实验挑选水稻 osamiR156 和 osamiR397 及其相应的靶标基因作为验证对象, 以检验在水稻原生质体中检测 miRNA 靶标基因的方法是否可行。以往的实验已证实水稻 osamiR156 可以靶向剪切 *OsSPL14* 基因的转录产物从而影响水稻的株型^[10]; osamiR397 的靶标则是水稻的类漆酶基因 *OsLAC*, 该基因影响水稻种子大小和花序分支, 对水稻产量有重要

影响^[11]。如图 1 所示 *osaMIR156* 与其相应的 *GFPc* 和 *GFPnc* 基因分别共表达的载体是 pBI156spl 和 pBI156splm，而 *osaMIR397* 对应的载体则是 pBI397lac 和 pBI397lacm。

2.2 显微观察蛋白水平差异

将 pBI156spl 和 pBI156splm 转化水稻原生质体，静置培养 12 h 后，在激光共聚焦显微镜下观察 GFP 荧光强度。如图 2 (A, D) 所示，在相同的转化及培养条件下，pBI156spl、pBI156splm、pBI397lac 和 pBI397lacm 四种质粒转化的原生质体都能被激发绿色荧光，说明增加的后缀序列并未改变 GFP 蛋白的荧光特性。每种转化原生质体的观察样品随机选取 10 个视野进行拍照，统计总的细胞数目、发光的细胞数目以及细胞的发光强

度。如图 2B 所示，统计结果表明，pBI156splm 载体转化的原生质体平均发光率（发光细胞数/总细胞数）达到 39%，是 pBI156spl 载体转化的原生质体平均发光率（14%）的 2.8 倍。pBI156splm 载体转化的原生质体的平均相对荧光强度达 6.25×10^{-3} ，多于 pBI156spl 载体转化的原生质体的平均相对荧光强度 1.73×10^{-3} ，二者存在明显差异 ($P<0.01$ ，图 2C)。同样，pBI397lacm 载体转化的原生质体的平均发光率和平均发光强度分别是 31%和 5.06×10^{-3} ，都明显大于 pBI397lac 载体转化的原生质体的平均发光率和平均发光强度（分别是 18%和 2.41×10^{-3} ）($P<0.01$ ，图 2E, 2F)。说明通过水稻原生质体 GFP 荧光观察可以判断 miRNA 和其候选靶标基因的调控关系。

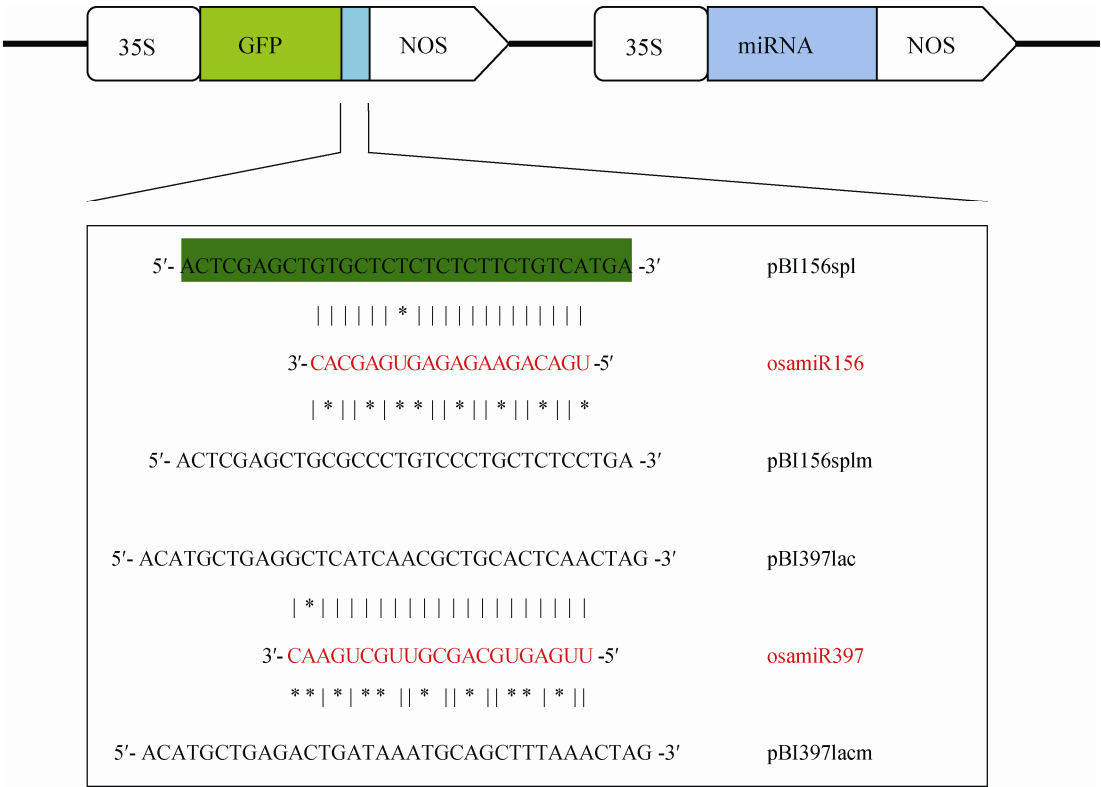
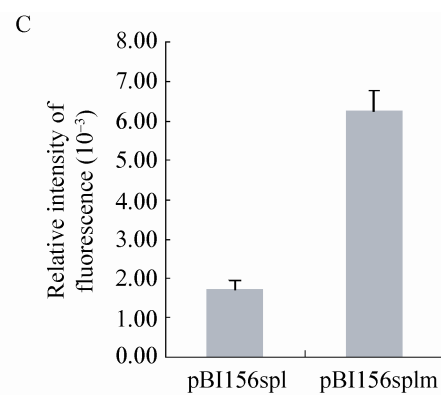
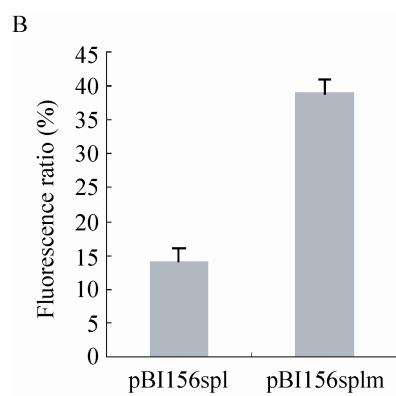
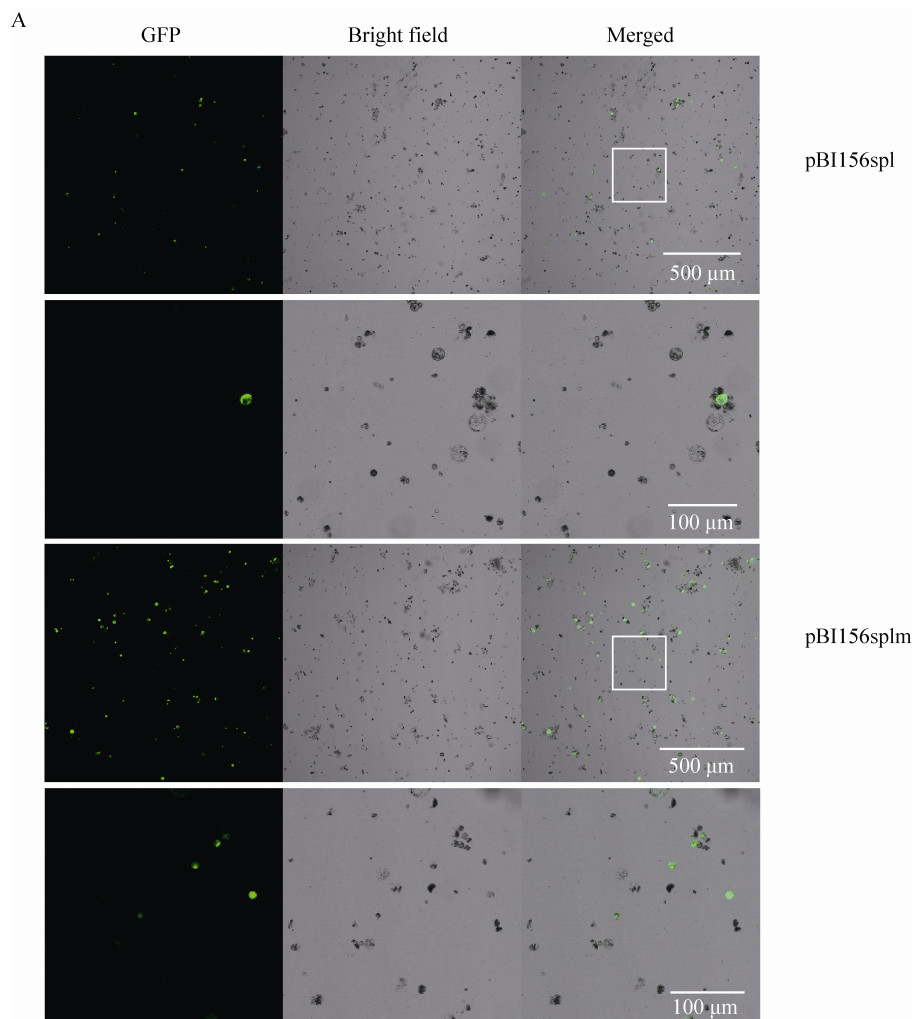


图 1 瞬时共表达 miRNA 和融合靶标序列的 GFP 基因载体构建图谱
Fig. 1 Schematic diagram of constructs for coexpression of miRNA and GFP gene fused with target sequences.



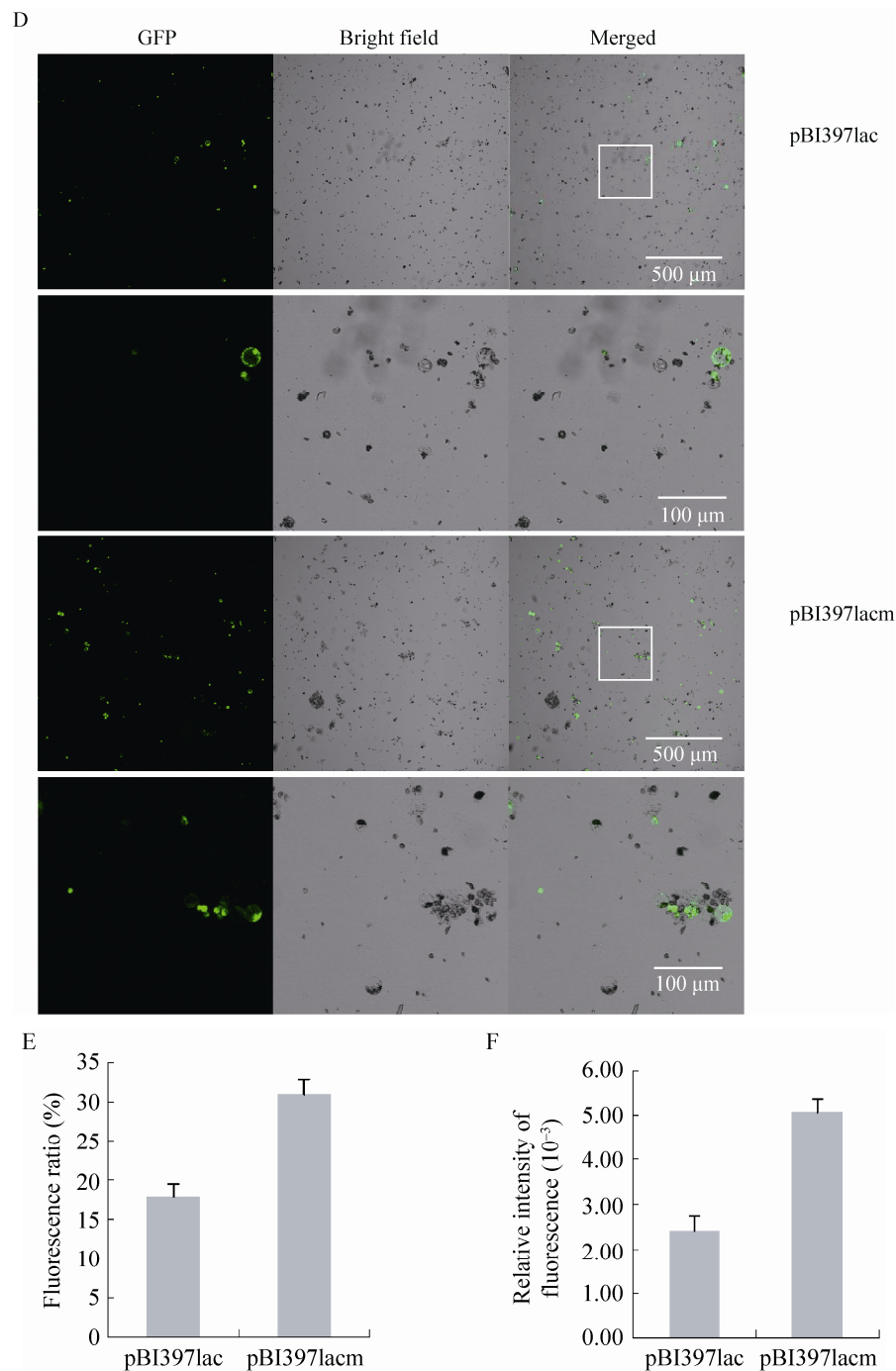


图 2 原生质体中 GFP 显微荧光观察及定量统计

Fig. 2 Microscopic observation and quantitative statistics of protoplast GFP fluorescence. A and D: GFP excitation of rice protoplasts transfected by pBI156spl, pBI156splm, pBI397lac and pBI397lacm. Bottom panels are enlarged sections of square shown in top panel. B and D: fluorescent ratio of rice protoplasts transfected by pBI156spl, pBI156splm, pBI397lac and pBI397lacm. C and F: relative intensity of fluorescence of rice protoplasts transfected by pBI156spl, pBI156splm, pBI397lac and pBI397lacm. Each column represents an average of ten replicates, and bars indicate SDs.

2.3 qRT-PCR 检测 RNA 水平差异

为进一步验证通过 GFP 荧光观察方法的可靠性,我们通过 qPCR 方法对 miRNA 和融合靶标序列的 *GFP* 表达水平进行检测。提取上述进行荧光观察的原生质体的总 RNA,对 RNA 尾部加 A 后,用 poly(T) adapter 进行逆转录。逆转录产物用 miRNA 特异引物序列和 poly(T) adapter 特异反向引物进行 qPCR 反应,检测样品中 miRNA 的水平;用 *GFP* 基因特异引物 gfpqrt 和 RP 引物检测样品

中 *GFP* 基因 mRNA 的水平。

检测结果表明,在水稻原生质体中 osamiR156 和 osamiR397 能够有效表达。以水稻 *actin* 基因作为内参, pBI156spl 和 pBI156splm 质粒转化的原生质体中 osamiR156 的水平明显高于空载体 pBI221-PML 对照 (图 3A); pBI397lac 和 pBI397lacm 质粒转化的原生质体中 osamiR397 的水平也高于 pBI221-PML 对照 (图 3B)。

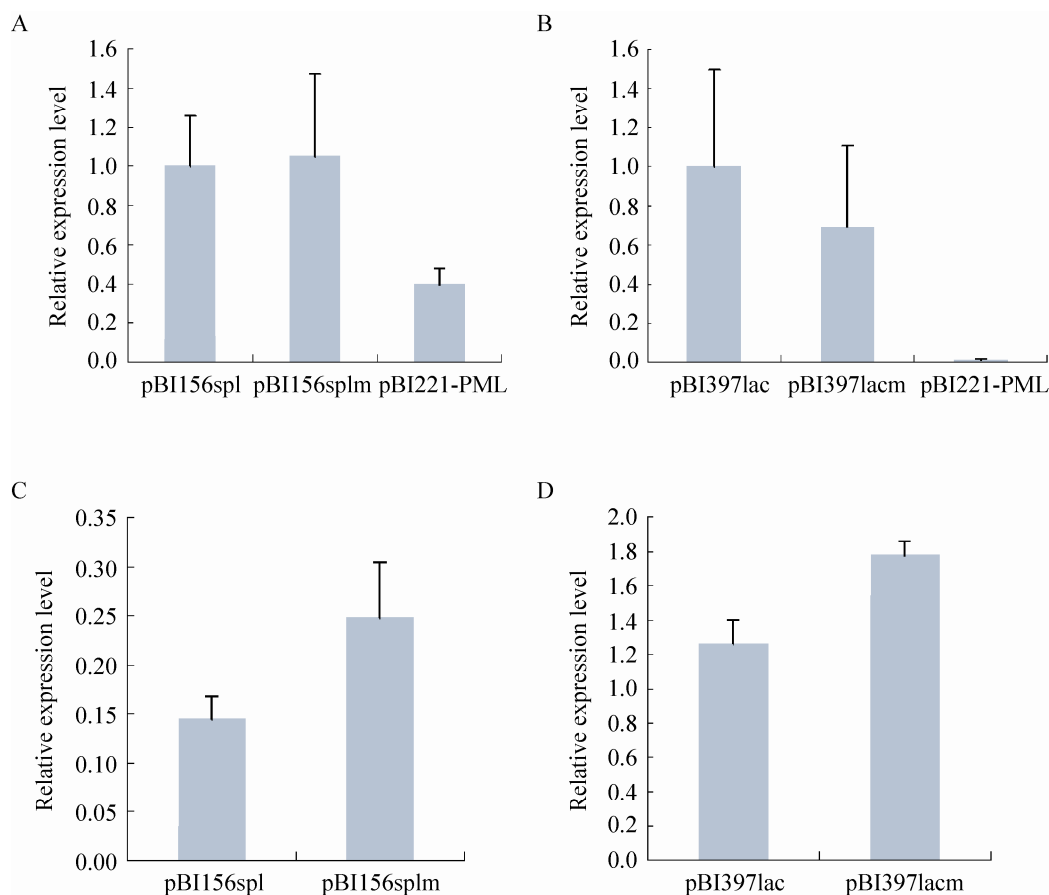


图 3 qRT-PCR 检测转化原生质体中 miRNA 和 *GFP* 基因的表达水平

Fig. 3 Quantification of miRNA and GFP transcripts in rice protoplasts by qRT-PCR. (A) Relative expression level of osamiRNA156 in protoplasts transfected with pBI156spl, pBI156splm, and control plasmid. (B) Relative expression level of osamiRNA397 in protoplasts transfected with pBI156spl, pBI156splm, and control plasmid. (C) Relative expression level of *GFP* in protoplasts with pBI156spl or pBI156splm, respectively. (D) Relative expression level of *GFP* in protoplasts with pBI397lac or pBI397lacm, respectively. Each column represents three replicates, and bars indicate SDs.

以 osamiR156 表达水平为内参, pBI156spl 转化原生质体中的 *GFP* 表达水平降至 pBI156splm 转化的原生质体的 58% ($P<0.05$, 图 3C); 同样, 以 osamiR397 的水平为内参, pBI397spl 质粒转化的原生质体中的 *GFP* 表达水平降至 pBI397lacm 质粒转化的原生质体的 71% ($P<0.05$, 图 3D)。结果表明, 后缀可被剪切靶标序列的 *GFP* 基因转录物水平明显低于后缀不可被剪切的 *GFP* 基因转录物, 说明 miRNA 靶标序列确实受 miRNA 调节影响其表达水平。

3 讨论

MicroRNAs 是一类调节基因表达的小 RNA, 在动植物等真核生物及某些 DNA 病毒中均有发现^[12], 在细胞生长发育及应对外界生物和非生物胁迫等反应中发挥重要作用^[13-17]。据 miRBase 数据库显示, 水稻基因组中已预测有 592 种 miRNA, 其中大部分还未知其靶标基因。由于 miRNA 和靶标 RNA 的互补程度具有可变性, 决定了 miRNA 与靶标作用是冗余的^[18-19]。另外, microRNA 及靶标基因表达有时空特异性, 使得直接克隆 miRNA 和验证其靶标基因的工作变得十分繁琐而具有挑战性。通过计算机预测 miRNA 的靶标基因, 对研究这些 miRNA 的调控功能至关重要。目前, 验证 miRNA 和靶标基因相互关系的实验方法很多, 其中通过 5'RACE 检测 RNA 中是否有目标基因在靶向序列处的剪切产物是较常用的方法^[20]。这种方法快速直接, 但是实验结果仍需要其他方法的辅助验证。另外, 也可以采取在 miRNA 靶标基因缺失的植物体内, 通过转基因过表达靶标基因和靶标序列突变的目的基因, 比较二者的表达水平差异的方法^[10]; 或者通过构建转基因植株使

miRNA 的表达水平不同, 并检测靶标基因的表达差异的方法^[11]。这种植物体内的遗传验证方法的优点是比较稳定, 但是操作周期长。也有利用农杆菌注射瞬时表达的方法, 在烟草体内检测 miRNA 对靶标基因的调控作用^[20], 但是在双子叶植物体系中并不适宜检测单子叶植物水稻的 miRNA 及其靶标基因, 因为双子叶和单子叶植物中与剪切靶标基因的蛋白并不完全相同, 如 AGO 蛋白, 在水稻中有 19 个, 拟南芥中有 10 个, miRNA 与 AGO 的结合有一定偏好性^[21]。

在真核生物中, 小 RNA 对靶标基因的调控分为转录后的 RNA 干扰以及转录水平上的染色体修饰^[22]。本方法是一种适宜检测 microRNA 转录后调控的简易方法, 可以在水稻体内快速验证 miRNA 和其靶标基因的调控关系。我们用水稻幼苗制备原生质体, 载体转化效率约为 40%, 为后续基因检测提供便利。通过将 miRNA 及 *GFP*/靶标序列融合基因串联表达载体转化水稻原生质体, 既可以通过 *GFP* 荧光强度推断 miRNA 对靶标序列的作用效果, 又可以通过 qPCR 对含有靶标序列的融合基因 mRNA 水平进行定量, 如果含有目标序列和突变目标序列的 *GFP* 融合基因的表达具有统计学差异, 则判断 miRNA 与靶标序列存在调控关系。此方法可以快速简便地在水稻体内验证 miRNA 及其候选目标 mRNA 的关系, 与转基因方法相比具有很大优势。另外, 在其他单子叶植物中, 如玉米, 与水稻中编码 DCL、AGO 和 RDR 基因数目相近, 进化树分析也显示这些基因的亲缘关系^[23], 因此, 也可以利用水稻原生质体研究与水稻亲缘关系较近的物种中新的 miRNA 及其靶标的调控关系。

REFERENCES

- [1] Voinnet O. Post-transcriptional RNA silencing in plant-microbe interactions: a touch of robustness and versatility. *Curr Opin Plant Biol*, 2008, 11(4): 464–470.
- [2] Gaur RK, Rossi JJ. Regulation of gene expression by small RNAs. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009: 9.
- [3] 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(5): 843–854.
- [4] Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2000, 403(6772): 901–906.
- [5] Li YF, Zheng Y, Addo-Quaye C, et al. Transcriptome-wide identification of microRNA targets in rice. *Plant J*, 2010, 62(5): 742–759.
- [6] Llave C, Xie ZX, Kasschau KD. Cleavage of scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science*, 2002, 297(5589): 2053–2056.
- [7] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002: 1595–1596.
- [8] Bart R, Chern M, Park CJ, et al. A novel system for gene silencing using siRNAs in rice leaf and stem-derived protoplasts. *Plant Methods*, 2006, 2: 13.
- [9] Shi R, Chiang VL. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. *BioTechniques*, 2005, 39(4): 519–524.
- [10] Jiao YQ, Wang YH, Xue DW, et al. Regulation of OsSPL14 by OsmiR156 defines ideal plant architecture in rice. *Nat Genet*, 2010, 42(6): 541–545.
- [11] Zhang YC, Yu Y, Wang CY, et al. Overexpression of microRNA Osmir397 improves rice yield by increasing grain size and promoting panicle branching. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 848–855.
- [12] Cuperus JT, Fahlgren N, Carrington JC. Evolution and functional diversification of MIRNA genes. *Plant Cell*, 2011, 23(2): 431–442.
- [13] Neilson JR, Zheng GXY, Burge CB, et al. Dynamic regulation of miRNA expression in ordered stages of cellular development. *Genes Dev*, 2007, 21(5): 578–589.
- [14] Zhu QH, Spriggs A, Matthew L, et al. A diverse set of microRNAs and microRNA-like small RNAs in developing rice grains. *Genome Res*, 2008, 18(9): 1456–1455.
- [15] Fritz JH, Girardin SE, Philpott DJ. Innate immune defense through RNA interference. *Sci STKE*, 2006, 2006(339): pe27.
- [16] Nonogaki H. MicroRNA gene regulation cascades during early stages of plant development. *Plant Cell Physiol*, 2010, 51(11): 1840–1846.
- [17] Khraiweh B, Zhu JK, Zhu JH. Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1819(2): 137–148.
- [18] Brennecke J, Stark A, Russell RB, et al. Principles of MicroRNA-target recognition. *Plos Biol*, 2005, 3(3): 405–418.
- [19] Bartel DP, Chen CZ. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(5): 396–400.
- [20] Llave C, Xie ZX, Kasschau KD, et al. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science*, 2002, 297(5589): 2053–2056.
- [21] Kapoor M, Arora R, Lama T, et al. Genome-wide identification, organization and phylogenetic analysis of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA Polymerase gene families and their expression analysis during reproductive development and stress in rice. *BMC Genomics*, 2008, 9(1): 451–467.
- [22] Finnegan EJ, Matzke MA. The small RNA world. *J Cell Sci*, 2003, 116(23): 4689–4693.
- [23] Qian YX, Cheng Y, Cheng X, et al. Identification and characterization of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA polymerase gene families in maize. *Plant Cell Rep*, 2011, 30(7): 1347–1363.

(本文责编 陈宏宇)