

## 萱草microRNAs生物信息学及与冷冻相关microRNAs的分析

安凤霞<sup>1,2</sup>, 卢宝伟<sup>3</sup>, 梁鸣<sup>2</sup>, 唐焕伟<sup>2</sup>, 李富恒<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨150030; <sup>2</sup>黑龙江省科学院自然与生态研究所, 湿地与生态保育国家地方联合工程实验室, 黑龙江省特色动植物利用工程技术研究中心, 哈尔滨150040; <sup>3</sup>黑龙江生态工程职业学院, 哈尔滨150025

**摘要:** microRNA是一类长度为16~29 nt的非蛋白质编码的内源小分子RNA (sRNA), 在植物生长发育以及逆境胁迫响应等过程中发挥着重要作用。本文利用基于HiSeq原理的sRNA深度测序技术, 结合生物信息学方法对萱草根系中已知miRNA的类型、丰度以及部分与冷冻胁迫相关的已知miRNA的功能进行了分析。结果表明, 在10 °C常温和-25 °C低温条件下萱草根系中分别有14 843 184和16 072 575条序列信息, 代表14 064 385和15 309 725种sRNA片段, 且sRNA均呈现正态分布特征; 在非编码RNA中转运RNA (tRNA)、核糖体RNA (rRNA)所占比例较大。低温sRNA组中得到注释的sRNA有67 411种, 共计799 994条sRNA片段; 常温sRNA组中, 得到注释的sRNA有66 524种, 共计1 055 466条sRNA片段。冷冻胁迫下, 萱草通过提高*miR393*、*miR397*、*miR396*的表达量和降低*miR319*的表达量来增强其抗冻性。本研究为后续揭示萱草低温应答蛋白合成的调控机理, 筛选抗冻关键调控基因提供了丰富的数据。

**关键词:** 萱草; miRNA; 生物信息学; 低温; 深度测序

## Bioinformatics, Expression and Functional Analysis of microRNAs in Response to Low Temperature in *Hemerocallis fulva* (L.) L.

AN Feng-Xia<sup>1,2</sup>, LU Bao-Wei<sup>3</sup>, LIANG Ming<sup>2</sup>, TANG Huan-Wei<sup>2</sup>, LI Fu-Heng<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>School of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; <sup>2</sup>Natural and Ecological Institute, Heilongjiang Academy of Sciences, National and Provincial Joint Engineering Laboratory of Wetlands and Ecological Conservation, Characteristic Animal and Plant Utilization Engineering Technology Research Center of Heilongjiang Province, Harbin 150040, China; <sup>3</sup>Heilongjiang Vocational Institute of Ecological Engineering, Harbin 150025, China

**Abstract:** MicroRNAs (miRNAs), as endogenous small non-coding single-stranded RNAs of 16–29 nt, play a prominent role in the process of growth, development and responses to environmental stresses in plants. The miRNAs in response to low temperature in *Hemerocallis fulva* roots were identified using deep-sequencing technique in combination with bioinformatics prediction. A total of 14 843 184 and 16 072 575 RNA sequences were explored under normal and low temperature conditions, which represented 14 064 385 and 15 309 725 types of small RNA (sRNA), respectively. The sRNA showed a normal distribution. Through GenBank and Rfam comparison analysis, rRNA and tRNA accounts for a larger proportion in non-coding RNA. Totally 799 994 sRNA in 67 411 types were annotated under low temperature, and 1 055 466 sRNAs in 66 524 types were annotated under normal temperature. *miR393*, *miR397* and *miR396* were up-regulated and *miR319* was down-regulated at low temperature. This research provides rich data for illuminating the regulatory mechanism of protein synthesis and screening the key regulatory genes in response to low temperature.

**Key words:** *Hemerocallis fulva*; miRNA; bioinformatics; low temperature; deep-sequencing

microRNA (miRNA)是一类来自真核生物自身基因组的非编码小分子RNA (sRNA), 长度范围在16~29 nt, 主要在转录后水平负向调节基因表达 (Zhang等2009a)。自2002年以来, 植物中已有大量的miRNA相继被发现。近年来, 在前人研究基础上发展起来的sRNA深度测序技术, 能够从全基因组水平大范围地发掘已知和未知、保守和非保守的miRNA, 构建样品间的sRNA差异表达谱, 是

sRNA功能研究的有力工具, 进而在植物miRNA的发掘中得到广泛应用。越来越多的研究表明, miRNA在植物的生长发育、激素调节、信号转导

收稿 2013-12-04 修定 2014-03-25

资助 黑龙江省森工总局科技计划项目 (sgzjY2010026) 和黑龙江省科学院科学研究基金项目。

\* 通讯作者 (E-mail: an\_fengxia@163.com; Tel: 0451-86050321)。

及逆境胁迫反应等方面均具有重要的作用(Lauter等2005)。然而上述研究主要集中在基因组已被解析的拟南芥、水稻等模式植物上,对于非模式植物的研究较少。因此,拓宽研究物种对于快速准确地鉴定和系统深入地研究植物miRNA具有重大意义。

萱草是一种无性繁殖的多年生草本宿根植物,集抗干旱、抗寒、耐盐等多种抗逆性于一身,有多种抗逆基因可待发掘与利用,且具有较高的观赏、医疗和保健价值,发展潜力良好。目前国内、外尚未见萱草相关miRNA的报道。miRNA在结构和功能方面的保守性特点及深度测序技术在检测miRNA基因表达上的成功经验,为研究基因组信息较少的非模式植物中的miRNA提供了重要参考。基于此,本研究采用HiSeq高通量测序技术对萱草sRNA进行数字化检测,获得与冷冻胁迫相关的miRNA,以期在萱草中低温应答基因的调控、表达与合成等提供依据,并为今后研究萱草的抗寒作用机制奠定基础。

## 材料与amp;方法

### 1 材料

供试材料为萱草[*Hemerocallis fulva* (L.) L.] ‘红宝石’品种繁殖苗。种苗来源于东北农业大学生命科学学院植物学研究室,盆栽于东北农业大学生命科学学院实验基地。

取常规管理下苗龄90 d左右、长势基本一致的萱草‘红宝石’盆栽植株,置于SANYO人工气候箱(上海仪纯实业有限公司)中,正常温度为10℃,“均一化”处理14 d后进行低温处理,即由10℃梯度降温至-25℃处理14 d,光照/黑暗时间为12 h/12 h,相对湿度控制在80%左右;以10℃为对照。胁迫处理和对照均设2次生物学重复。取同一条根作为试验材料,迅速放入液氮中冷冻,置-80℃保存备用。

### 2 方法

#### 2.1 总RNA的提取

将试验材料用无菌水冲洗干净后擦干,采用Trizol法提取总RNA,核酸测量仪检测浓度及纯度,变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)鉴定其质量,将经胁迫处理和对照材料中提取的总RNA等量混匀后,用Agilent 2100生物分析仪分析RNA的完整性。

#### 2.2 sRNA文库构建及测序

分别称取等量的经胁迫处理和对照试验材料,各自混合均匀后作为样品材料,提取总RNA,用于sRNA文库构建。总RNA经15%变性PAGE分离,将长度范围在17~24 nt的sRNA切胶回收,纯化后的sRNA分别经5’接头和3’接头连接后RT-PCR扩增,构建成sRNA的cDNA文库,直接用于深度测序。深度测序采用HiSeq技术,由华大基因公司完成。

#### 2.3 sRNA序列生物信息学分析

将HiSeq测序获得的sRNA序列,通过去接头、去低质量、去污染、统计序列长度分布等过程完成初级分析,得到的序列进行分类注释,可以获得样品材料中包含的各组分及表达量信息。剩余的sRNA序列与miRNA数据库(release 18)中所有的miRNA序列进行比对,得到样品中已知miRNA的含量和表达丰度等信息。

## 结果与amp;讨论

### 1 萱草miRNA生物信息学初步分析

#### 1.1 RNA完整性

用Agilent生物分析仪检测RNA完整性的结果显示,对照和经胁迫处理材料中提取RNA的28S/18S(样品纯度)值均为1.4,RIN值分别为7.2和7.6,浓度分别为442和318 ng·μL<sup>-1</sup>,符合HiSeq高通量测序样品质控标准(植物样品纯度:28S/18S≥1;植物样品浓度≥100 ng·μL<sup>-1</sup>;RNA完整性:植物和真菌RIN值≥6.5),说明提取的RNA未降解,完整性较好,满足样品制备的要求,可用于测序。

#### 1.2 萱草sRNA片段类型和数量

采用MATLAB统计分析在10和-25℃下分别挖掘出的14 843 184和16 072 575条萱草RNA序列信息,这些序列分别代表14 064 385和15 309 725种sRNA片段,分别占总数的94.88%和95.38%(表1)。

#### 1.3 萱草根系中sRNA片段长度的分布

在10和-25℃条件下,萱草根系中sRNA的分布均呈现出正态分布特征,除个别外,不同长度sRNA所占的比例大体一致,其中24 nt的sRNA均为主要类型,分别占sRNA总数的45.53%和47.42%;这与普遍认为的miRNA长度多集中分布在20~24 nt的结论较为一致。

表1 萱草根系中sRNA片段类型、数量和百分比

Table 1 The type, number and percentage of sRNA in *H. fulva* roots

片段类型	-25 °C		10 °C	
	数量	百分比/%	数量	百分比/%
总读数	16 072 575		14 843 184	
高质量序列	16 051 297	100.00	14 822 609	100.00
3'无效衔接蛋白	4 593	0.03	3 870	0.03
无效插入片段	1 244	0.01	1 384	0.01
5'污染物衔接蛋白	19 101	0.12	13 937	0.09
小于18 nt片段	713 838	4.45	736 049	4.97
多聚腺苷酸	2 796	0.02	2 984	0.02
干净序列	15 309 725	95.38	14 064 385	94.88

本研究中两个sRNA文库的Unique sRNA序列和sRNA序列的长度分布都存在明显差异, -25 °C条件下萱草根系中的sRNA片段无论在种类上还是在数量上都较10 °C下的多(图1), 说明低温对萱草的sRNA表达有显著影响。

## 2 萱草sRNA分类注释

将本研究的测序结果与miRBase数据库进行比对, 在-25和10 °C条件下分别筛选出199和229种保守的miRNA序列, 共得到13 885和8 577条干净序列; 没有比对到任何注释信息的sRNA序列种类分别为7 561 937和6 994 850种, 占sRNA总类型数(14 503 620)和总数(12 996 096)的比例为94.73%和92.40%。-25 °C低温样品的sRNA中得到注释的有

67 411种共计799 994条sRNA片段; 10 °C常温样品的sRNA中, 得到注释的有66 524种共计1 055 466条sRNA片段(表2)。

分类注释结果中核糖体RNA (rRNA)的总量可以作为样品的质控标准, 即当所提取植物样品中的rRNA总量占sRNA总数比例低于60%时, 认为其质量较好, 数据可靠。本研究中萱草低温和常温样品的rRNA总量所占比例仅为3.44%和3.55%, 均大大低于60%, 说明sRNA质量可靠, 可用于测序分析。

## 3 萱草中与低温相关miRNA的表达和功能

低温胁迫下植物通过转录水平和转录后水平共同调控基因的表达与翻译, 以响应低温胁迫, 其中miRNA参与的转录后调控是近期研究的热点。植物miRNA与逆境胁迫的联系促使研究者将miRNA加入到低温胁迫基因应答的调控网络中, 以期更深刻、全面地理解植物应答低温胁迫的机制。本研究对与萱草低温相关且目前研究较多的几个主要miRNA的表达和功能进行了分析, 结果如表3所示。

### 3.1 miR319

本研究结果显示, miR319在低温胁迫下读取次数(表达丰度)为212次, 常温下读取次数为409次(表3), 由此可见, 随着温度的降低, 其表达丰度呈现下降趋势, 说明miR319在萱草的冷冻胁迫中起负调控作用。

miR319家族有3个成员, 分别是miR319a、miR319b和miR319c。Thiebaut等(2012)发现, 甘蔗幼苗经4 °C处理, miR319在根和叶中表达量均上升, 但在耐寒品种中表达延迟且表达量更低。从而说明miR319在植物低温胁迫应答中起重要作用。

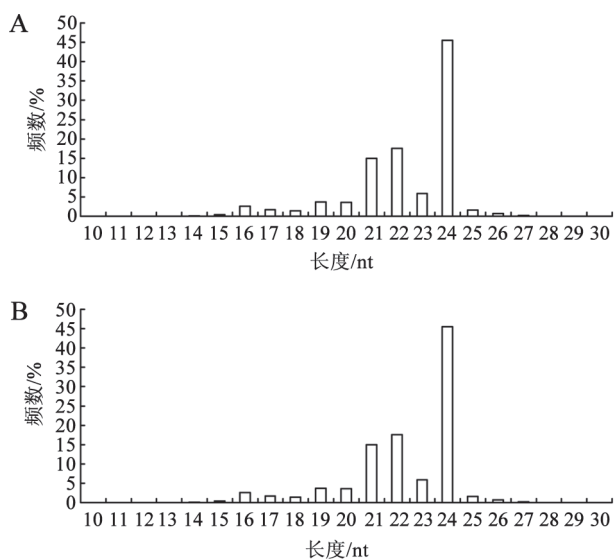


图1 萱草sRNA片段长度分布

Fig.1 The length distribution of sRNA fragments in *H. fulva*

A: -25 °C; B: 10 °C.

表2 各类sRNA总类型数和总数

Table 2 The total number of types and total number of sRNA

分类	-25 °C		10 °C	
	sRNA总类型数(百分比/%)	sRNA总数(百分比/%)	sRNA总类型数(百分比/%)	sRNA总数(百分比/%)
总数	7631 739 (100.00)	15 309 725 (100.00)	7 068 345 (100.00)	14 064 385 (100.00)
反义外显子	712 (0.01)	1 179 (0.01)	1 996 (0.03)	3 765 (0.03)
识别外显子	1 272 (0.02)	2 435 (0.02)	2 524 (0.04)	5 244 (0.04)
基因区内外显子	690 (0.01)	1 076 (0.01)	879 (0.01)	1 409 (0.01)
识别内含子	717 (0.01)	1 411 (0.01)	1 127 (0.02)	2 405 (0.02)
miRNA	199 (0.00)	110 230 (0.72)	229 (0.00)	98 950 (0.70)
转运RNA	52 982 (0.69)	526 769 (3.44)	52 998 (0.75)	499 436 (3.55)
重复序列	2 295 (0.03)	13 885 (0.09)	1 867 (0.03)	8 577 (0.06)
小核RNA	2 410 (0.03)	7 418 (0.05)	2 133 (0.03)	5 171 (0.04)
核仁小RNA	810 (0.01)	2 004 (0.01)	1 020 (0.01)	3 396 (0.02)
核糖体RNA	7 715 (0.1)	139 698 (0.91)	8 722 (0.12)	439 936 (3.13)
未注释片段	7 561 937 (99.09)	14 503 620 (94.73)	6 994 850 (98.96)	12 996 096 (92.40)

表3 萱草中几个与低温胁迫相关的miRNA表达谱

Table 3 miRNA expression profiling related to low temperature stress in *H. fulva*

miRNA家族	读取次数		序列
	10 °C	-25 °C	
<i>miR319</i>	409	212	5'-TTGGACTGAAGGGAGCTCCCT-3'
<i>miR393</i>	87	102	5'-TTCCAAAGGGATCGCATTGATC-3'
<i>miR396</i>	221	441	5'-TTCCACAGCTTTCTTGAAGCTG-3'
<i>miR397</i>	6	15	5'-TCATTGAGTGCAGCGTTGATG-3'

### 3.2 *miR393*

由表3可见, *miRNA393*在常温下的读取次数为87次, 经低温胁迫后其读取次数为102次, 随温度降低, 表达丰度上升, 因此初步分析认为, *miRNA-393*对萱草低温逆境的调控作用趋于正向调控, 这与以往的研究结果较为一致。

冷胁迫下, 拟南芥通过提高*miR393*的表达量从而增强了其抗冷性, 其主要原因是*miR393*的靶基因泛素连接酶E3的表达量下调, 导致冷诱导蛋白生成量增加(Sunkar和Zhu 2004)。Zhang等(2009b)通过全基因组测序法与芯片杂交法证实, 低温可以诱导*miR393*表达, 这与Sunkar和Zhu (2004)的研究结果一致。*miR393*的靶基因转录因子与冷响应转录激活因子(CRT/DRE binding factor, CBF)启动子的转录因子(inducer of CBF expression 1, ICE1)蛋白属于同一家族, 低温下ICE1结合在*CBF3*的启动子区域, 激活*CBF3*基因的表达, 而*CBF*可以激活下游众多与抗逆有关的功能基因的表达(Chinnusamy等2010)。因此, 推测*miR393*可能在植物

低温胁迫应答中起重要作用(张志明等2010)。

### 3.3 *miR396*

本研究结果表明, *miR396*的表达丰度经过低温胁迫后呈现显著上调表达趋势(表3), 因此推测萱草体内可能存在一个以*miR396*为枢纽的调节系统, 将*miR396*基因上游调控元件及调控因子和*miR396*的靶标紧密相连, 构成逆境胁迫下机体维持自身正常代谢和自我保护的一条通路。

*miR396*分布于36个物种中, 属于植物中高度保守的一类miRNA, 它广泛参与多种逆境胁迫响应(Carlsbecker等2010)。Liu等(2008)在研究拟南芥逆境胁迫相关miRNA时发现, *miR396*参与拟南芥低温响应, 其中*miR396a*和*miR396b*的启动子区域存在低温相关响应元件。Gao等(2011)发现*miR396c*基因上游启动子区域存在防卫相关的元件, 然而这些作用元件并没有引起下游*miR396c*基因在低温胁迫条件下的上调表达。由此, 我们推测*miR396*在低温下的表达模式也许是低温胁迫响应元件与其他调控元件协同作用的结果。

### 3.4 miR397

本研究中miR397随温度下降表达丰度呈现显著上升趋势(表3), 可见, 低温胁迫可以诱导miR397的表达。表明miR397可能在萱草抵御低温逆境过程中起作用。

Zhang等(2009b)证实低温可以诱导miR397表达。Sunkar和Zhu (2004)发现miR397在低温胁迫下表达, 同时miR397在高盐环境中也同样表达。miR397的靶基因与低温适应过程密切相关(张志明等2010)。

通过上述研究推测, 当萱草遭遇低温恶劣外界条件时, 通过调控miRNA的表达, 改变相应的靶基因表达活性, 使机体代谢向有利于自身生长的方向进行, 防止低温胁迫对机体的伤害。

本研究结果为系统分析萱草miRNA抗冻反应机制奠定了基础, 还将为后续深入揭示萱草抗逆应答蛋白合成的调控机理、关键调控基因的筛选以及其他相关的代谢途径和基因的获得, 提供数据支持。

### 参考文献

张志明, 宋锐, 彭华, 罗茂, 沈亚欧, 刘丽, 赵茂俊, 潘光堂(2010). 用生物信息学挖掘玉米中的microRNAs及其靶基因. 作物学报, 36 (8): 1324~1335

- Carlsbecker A, Lee JY, Roberts CJ, Dettmer J, Lehesranta S, Zhou J, Lindgren O, Moreno-Risueno MA, Vatén A, Thitamadee S et al (2010). Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature*, 465 (7296): 316~321
- Chinnusamy V, Zhu J, Sunkar R (2010). Gene regulation during cold stress acclimation in plants. *Methods Mol Biol*, 639: 39~55
- Gao P, Bai X, Yang L, Lv D, Pan X, Li Y, Cai H, Ji W, Chen Q, Zhu Y (2011). *osa-MIR393*: a salinity-and alkaline stress-related microRNA gene. *Mol Biol Rep*, 38 (1): 237~242
- Lauter N, Kampani A, Carlson S, Goebel M, Moose SP (2005). *MicroRNA172* down-regulates *glossy15* to promote vegetative phase change in maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102 (26): 9412~9417
- Liu HH, Tian X, Li YJ, Wu CA, Zheng CC (2008). Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA*, 14 (5): 836~843
- Sunkar R, Zhu JK (2004). Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16 (8): 2001~2019
- Thiebaut F, Rojas CA, Almeida KL, Grativol C, Domiciano GC, Lamb CRC, De Almeida Engler J, Hemerly AS, Ferreira PCG (2012). Regulation of *miR319* during cold stress in sugarcane. *Plant Cell Environ*, 35 (3): 502~512
- Zhang B, Stellwag EJ, Pan X (2009a). Large-scale genome analysis reveals unique features of microRNAs. *Gene*, 443 (1~2): 100~109
- Zhang JY, Xu YY, Huan Q, Chong K (2009b). Deep sequencing of *Brachypodium* small RNAs at the global genome level identifies microRNAs involved in cold stress response. *BMC Genomics*, 10: 449