

番茄*MIR398*基因的克隆及其在烟草中的表达分析

贺晓丽, 刘萍, 栾雨时*

大连理工大学生命科学与技术学院, 辽宁大连116024

摘要: miRNA作为真核生物的一类调控因子, 在植物胁迫应答中发挥着重要的作用, 成熟的miRNAs能降解或者阻遏靶mRNA的翻译。为从不同角度揭示miR398的生物学功能, 我们从番茄中克隆到*MIR398*基因并构建了该基因的过表达载体pBI121-*MIR398*, 通过农杆菌介导的叶盘法将重组质粒导入异源植物烟草中, 利用psRNATarget预测miR398在烟草中的靶基因有*PR5*和*CSD*等。采用实时定量PCR检测基因表达, 发现转基因烟草中*MIR398*的表达量增加, 靶基因的表达量减少, 为阐明miR398的异源调控功能奠定了基础。

关键词: miR398; 烟草; 胁迫应答; *PR5*; *CSD*

Cloning of Tomato *MIR398* Gene and Its Expression Analysis in Tobacco

HE Xiao-Li, LIU Ping, LUAN Yu-Shi*

School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning 116024, China

Abstract: As a kind of regulatory factor in eukaryote, miRNA plays an important role in the plant stress response. The mature miRNAs can degrade or repress the translation of the target mRNA. To explore the biological function of miR398, we cloned the *MIR398* gene from tomato and constructed the over-expression vector pBI121-*MIR398*. Then we introduced this over-expression vector into tobacco and predicted the target genes of miR398 in tobacco, which were *CSD*, *PR5* and so on. Then we detected the expression of *MIR398* and its target genes with real-time PCR and found that the expression level of *MIR398* was increased and its target was contrary, which provide a basis on elucidating the different source control of miR398.

Key words: miR398; tobacco; stress response; *PR5*; *CSD*

MicroRNAs (miRNAs)是在真核生物中发现的一类内源性的具有调控功能的非编码RNA, 大小为20~25个核苷酸, 是植物胁迫应答过程中不可或缺的调控因子。以往的研究证明植物miRNA可响应多种生物及非生物胁迫, 包括病毒和病菌的感染、高盐和干旱等(丁艳菲等2010)。成熟的miRNA与RISC (RNA induced silencing complex)结合后, 可通过直接剪切或翻译抑制的方式作用于靶基因, 实现对基因表达的调控。miRNA的作用机制取决于其与靶基因之间碱基互补配对的程度。当它们完全互补或近乎完全互补时, miRNA介导对其靶基因的剪切; 结合程度较低时, miRNA则会启动对其靶基因的翻译抑制(吕帝瑾等2013)。

截至目前, 人们已通过各种方法发现了数千个miRNA (Wang和Luan 2015), 但通过实验验证的miRNA及靶标远未达到饱和。此前, 我们利用同源比对的生物信息学方法(Luan等2014)以及支持向量机分类算法(孙超等2012)预测了番茄中保守的

miRNA, 得到了*pri-MIR398*的序列, 分析了*MIR398*的表达模式; 通过psRNATarget软件在线预测与NCBI搜索比对得到了miR398的靶基因有病程相关蛋白5 (pathogenesis-related proteins 5, *PR5*)和Cu/Zn超氧化物歧化酶(Cu/Zn superoxide dismutases, *CSD*)等。

*PR5*是植物体内的一类受病原物或其他外界因子胁迫而诱导表达的蛋白质, 在植物抵御疾病、响应外界胁迫以及适应不良环境等方面发挥着重要作用(张玉等2012)。在高盐胁迫下烟草中*PR5*的表达量增加, 而且在接种有印度梨形孢菌的烟草中*PR5*大量表达(惠非琼等2014)。*CSD*是活性氧(reactive oxygen species, ROS)的清除剂, 能够将具有剧毒的 O_2^- 等转变为毒性较小的 H_2O_2 , 植物中

收稿 2015-09-09 修定 2015-11-13

资助 国家自然科学基金(31272167和31471880)。

* 通讯作者(E-mail: luanyush@dlut.edu.cn; Tel: 0411-84706365)。

的miR398通过靶向CSD实现对病原物的抗性。CSD在多种逆境胁迫响应中扮演着重要角色,如调节铜代谢平衡,应答重金属、蔗糖、臭氧等非生物胁迫,以及参与生物胁迫响应等(丁艳菲等2010)。我们近期的研究发现,用疫霉菌处理番茄后,植株体内MIR398的表达量下降,而CSD的表达量升高(Luan等2015);鲁玉柱等(2011)的研究发现过表达CSD的水稻对重金属铜胁迫表现出良好的抗性。上述工作都为研究番茄中miR398的作用提供了重要信息。

在番茄与烟草植株中均有miR398的存在,但二者的基因序列存在一定的差异。目前,关于miR398与靶基因互作尤其是miR398在烟草中参与胁迫响应的报道相对较少。为了进一步研究miR398的功能,我们从番茄中克隆pri-MIR398基因,构建相应的过表达载体,利用农杆菌介导的叶盘法转化烟草,通过实时定量PCR检测烟草中MIR398及其靶基因的表达量变化,掌握miR398参与抗逆相关基因的调控方式,为全面揭示miR398参与抗逆相关基因的表达和异源调控机制奠定了基础。

材料与amp;方法

1 实验材料

醋栗番茄(*Solanum pimpinellifolium* L.)材料L3708、烟草(*Nictiana tabacum* L. cv. '89')、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101、大肠杆菌DH5 α 及质粒pBI121均为本实验室保存。RNAiso plus试剂、切胶回收试剂盒、T₄ DNA连接酶、限制性内切酶、pMD18-T载体、DNA Marker和Ex Taq均为大连宝生物公司产品。植物基因组DNA提取试剂盒和质粒提取试剂盒为天根公司产品。引物合成、测序工作在华大基因(北京)公司完成。

2 实验方法

2.1 番茄中MIR398基因的克隆

参照试剂盒的说明,提取番茄基因组DNA。根据我们得到的MIR398基因序列(GenBank: AC232704.1),用Primer 5软件设计其特异性引物进行PCR扩增,miR398-FP为5'-TACTTGGATTTG-TACCCT-3'; miR398-RP为5'-TCTGACTCTGT-CACCGAT-3'。将PCR产物与载体pMD18-T在16

℃下连接过夜,获得重组质粒pMD18-T-MIR398,用热激法将其转入大肠杆菌感受态细胞中,提取菌液质粒进行PCR扩增,用限制性内切酶EcoRI和HindIII对质粒进行双酶切鉴定。将阳性质粒送华大基因(北京)公司测序,分析结果。

2.2 植物过表达载体的构建

在MIR398的特异性引物的上、下游分别插入BamHI和SacI的酶切位点(下划线部分),以质粒pMD18-T-MIR398为模板进行PCR扩增并做电泳检测。引物序列为,miR398-FP: 5'-CGGGATCC-AATGATGATGAGCAATGGTG-3'; miR398-RP: 5'-CGAGCTCTCGTTGTTGGTGTAGAGTTA-3'。

分别将PCR产物和质粒pBI121于37℃双酶切过夜,回收纯化产物,在16℃下连接,获得MIR398与35S启动子基因融合的表达载体pBI121-MIR398。将其转入大肠杆菌感受态细胞,提取重组菌中的质粒做PCR检测和酶切验证。

2.3 农杆菌对烟草的转化

用冻融法将pBI121-MIR398转化至根癌农杆菌,挑取阳性菌落于新鲜的YEB培养基中,振荡培养后,以该菌液为模板进行PCR鉴定。采用农杆菌介导的叶盘法转化烟草,提取野生型和转化株的DNA,对MIR398进行PCR扩增,分别以pBI121-MIR398和水作阳性对照和空白对照,对比分析基因转化是否成功。

2.4 烟草中miR398的靶基因预测

用psRNA Target软件在线预测miR398在烟草中的靶基因,参数均设为默认值。在NCBI的BLAST程序中对靶基因序列进行搜索比对并确定其功能。

2.5 MIR398及其靶基因的表达特性以及抗逆作用的分析

利用TRIzol法提取转基因烟草和野生型烟草的RNA,以反转录后的cDNA为模板,通过QRT-PCR检测MIR398及其靶基因的表达情况。以番茄Actin(GenBank: U60478.1)作内参,MIR398下游引物使用试剂盒中的Uni-miR qPCR Primer,利用Primer 5设计MIR398的上游引物及其靶基因引物(表1)。

实验结果

1 番茄MIR398基因及其过表达载体

以番茄DNA为模板做PCR扩增,得到MIR398的电泳条带(图1-A),符合预期。将该目标条带回

表1 MIR398及其靶基因的实时定量PCR引物
Table 1 Real-time PCR primers of MIR398 and its target genes

引物名称	引物序列(5'→3')
miR398-FP	TGTGTTCTCAGGTCACCCCTT
PR5-FP	ACTTTGATGGTGCTGGTAGAG
PR5-RP	CGCGTATTCCGGCTAAGGTATT
CSD-FP	GCATGGTGCTCCTGAAAGAT
CSD-RP	TCTGCTTGTCGGTAATGGTAAA

收构建重组质粒pMD18-T-MIR398并转化大肠杆菌, 对获得的阳性克隆质粒测序, 结果与原始序列相同, 证明可以用于载体的构建。以pMD18-T-MIR398为模板进行PCR扩增, 得到带有限制性内切酶酶切位点的MIR398的片段(图1-B)。对质粒pBI121进行双酶切后, 获得2个大小不同的片段(图1-C), 回收大片段。

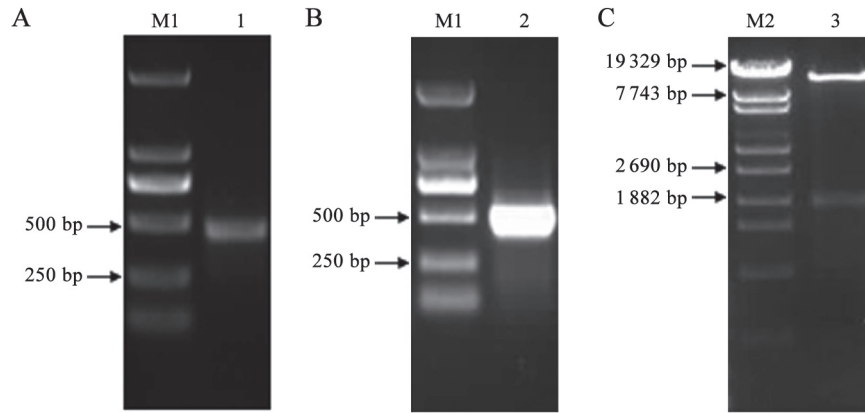


图1 MIR398 (A)及其加酶切位点的PCR产物(B)和质粒pBI121的双酶切(C)电泳

Fig.1 The electrophoresis of the PCR product of MIR398 (A) and its with cleavage site (B) and pBI121 double-enzyme cleavage (C)
M1: DL2000 DNA Marker; M2: λ-EcoT14 I DNA Marker; 1: MIR398的PCR产物; 2: 加酶切位点的MIR398的PCR产物; 3: 质粒pBI121的双酶切产物。

用pBI121-MIR398转化大肠杆菌, 对获得的阳性重组质粒进行PCR检测(图2-A)和酶切验证(图2-B), 所得电泳条带符合预期, 说明MIR398植物过表达载体构建成功。

2 MIR398转化烟草植株的获得

利用菌液PCR检测转化有pBI121-MIR398的农杆菌的阳性克隆, 电泳条带如图3所示。根据条带亮度, 选择6号菌株用于烟草的转化。

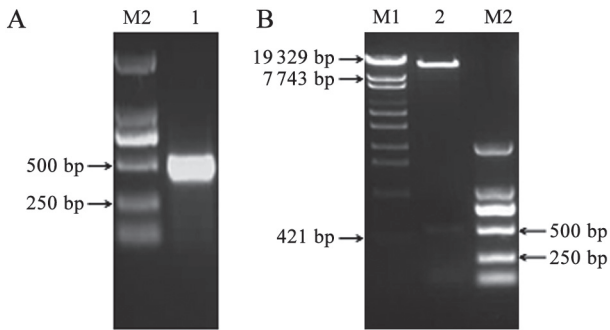


图2 重组质粒pBI121-MIR398的PCR检测(A)和双酶切验证(B)

Fig.2 The detection of pBI121-MIR398 by PCR (A) and double-enzyme cleavage (B)

M1: λ-EcoT14 I DNA Marker; M2: DL2000 DNA Marker; 1: MIR398的PCR产物; 2: pBI121-MIR398的双酶切产物。

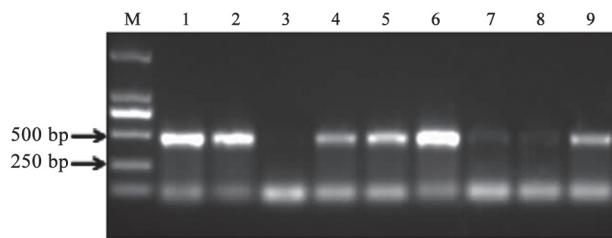
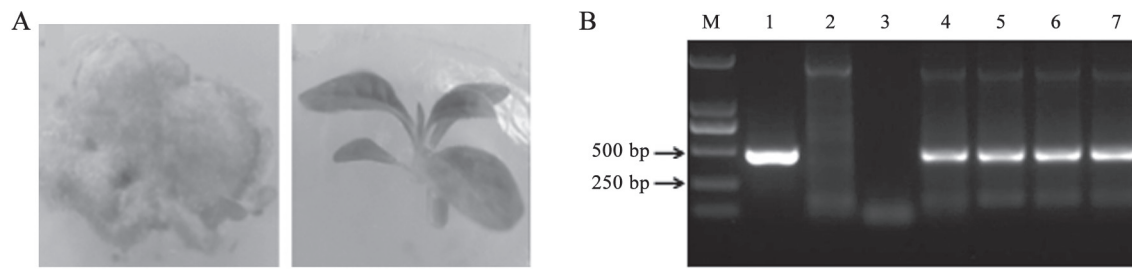


图3 菌液PCR检测目的基因导入农杆菌的阳性克隆
Fig.3 PCR analysis of the genes transformed into Agrobacterium
M: DL2000 DNA Marker; 1~9: 农杆菌工程菌株。

将侵染农杆菌的烟草叶片在分化培养基上(含500 mg·L⁻¹羧苄青霉素)培养至长出不定芽, 转移至含50 mg·L⁻¹卡那霉素和500 mg·L⁻¹羧苄青霉素的MS生根培养基上生长, 得到转化烟草(图4-A)。

图4 转*MIR398*基因烟草的获得(A)及其PCR检测(B)Fig.4 Acquire (A) and PCR analysis (B) of the *MIR398* transgenic tobaccoM: DL2000 DNA Marker; 1: pB1121-*MIR398*质粒; 2: 野生型烟草; 3: 空白对照; 4-7: *MIR398*转基因植株。

特异性扩增*MIR398*, 产物电泳结果(图4-B)显示, 转基因植株能够扩增出与阳性质粒一致的条带, 而野生型植株无目的条带, 说明*MIR398*基因成功转入烟草中。

3 烟草中预测得到miR398的靶基因

将psRNATarget软件预测得到的miR398的靶基因序列提交到NCBI的BLAST程序中进行比对得到其靶基因有*PR5*和*CSD* (表2)。

4 *MIR398*及其靶基因的表达

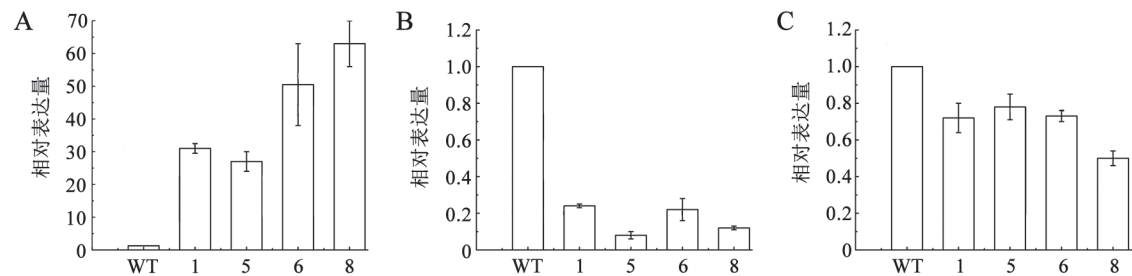
利用QRT-PCR对转基因烟草植株中*MIR398*及其靶基因的表达量进行分析, 发现*MIR398*的表

表2 miR398在烟草中的靶基因

Table 2 Potential targets of the miR398 in tobacco

靶基因	序列	NCBI序列号	配对比/%
<i>PR5</i>	AAGGGTCCACTGTTGA	XM009800707.1	80
<i>CSD</i>	AAGGGTCCAGTG	XM009777926.1	57

达量升高(图5-A), 表明所构建的过表达载体确实使目的基因在植株体内的表达量增加; 而靶基因*PR5*和*CSD*的表达量均有不同程度的下降, 尤其是*PR5*的下降程度更大(图5-B、C), 表明*MIR398*过表达会抑制*PR5*和*CSD*的表达。

图5 实时定量PCR检测转基因烟草中*MIR398* (A)及其靶基因*PR5* (B)和*CSD* (C)的相对表达量Fig.5 Real-time PCR analysis of *MIR398* (A) and its targets *PR5* (B) and *CSD* (C) in the transgenic tobaccoWT: 野生型烟草; 1、5、6、8: *MIR398*转基因烟草株系。

讨 论

在植物生长过程中, 难免会受到外界环境的影响, 对其产生各种胁迫, 参与植物抗逆过程的很多基因都是miRNA的靶标。作为第一个被报道的受多种胁迫调控的miRNA, miR398能对致病疫霉、高盐、干旱和ABA等胁迫做出不同模式的应答, 这些都源于miR398与其靶基因的调控作用 (Zhu等2011)。自Sunkar和Zhu (2004)在各种胁迫

下克隆了*MIR398*等26个与逆境胁迫应答相关的miRNA以来, 关于miR398在拟南芥、水稻和杨树等植物中响应各种胁迫的实验相继报道。Luan等 (2014)证实了番茄中存在保守的miR398, 并对其组织特异性以及在各种生物及非生物胁迫下的表达情况进行了分析, 发现*MIR398*在各种胁迫条件下的表达均受到抑制。本实验通过psRNATarget软件在线预测和NCBI比对, 得到miR398在烟草中的靶

基因有PR5和CSD, 并通过实验验证了它们之间的负调控关系。由于PR5和CSD均属于抗性基因, 会对各种胁迫产生防卫, 因此为研究番茄中miR398的抗逆相关性提供了一定的理论支持。

当植物受到病原物侵染时, 会积累大量的病程相关蛋白抵御其入侵, 保护自身免受攻击。枯草芽孢杆菌和烟草花叶病毒都会引起烟草防卫相关基因的表达, 激活ISR (诱导系统抗性)的SA信号通路和PR蛋白的表达(任鹏举等2014)。目前, 关于miRNA与PR5互作的报道相对较少, 本实验发现在MIR398过表达烟草植株中, PR5的表达受到明显的抑制, 初步判断二者之间存在负调控关系。由靶基因预测结果得知miR398与PR5的碱基互补配对程度相对较高; Zhang等(2011)的研究发现miR393*会通过调节MEMB12的表达, 间接的影响植株中PRI的表达量; 在PRI和PR5的表达模式分析中, 曾看到二者在干旱、乙烯等胁迫条件下表现出一致的响应(胡宗利等2009)。因此, 我们推断在烟草中可能存在其他因素间接地调节PR5的表达, 使烟草中PR5的表达量大幅增加。关于miR398的靶基因及其相应的调控机制还有待进一步研究。

在拟南芥中, miR398靶向两种CSD: 细胞质CSD1和叶绿体CSD2。CSD是植物抵御ROS毒害的最主要的超氧化物歧化酶(Mittler 2002)。低温胁迫下, 烟草叶片中H₂O₂和O₂⁻含量显著升高, 在烟草中异源表达番茄的LeMPK3基因会使SOD具有更强的抗氧化酶活性, 能够更好的清除ROS, 提高其抗低温胁迫能力(于力等2015)。这暗示了miR398可能在氧化胁迫响应中发挥一定的作用。CSD1在各种生物及非生物胁迫下与miR398表现出动态的负调控关系, 而CSD2表达量的变化并不完全与CSD1一致, 其表达量在重金属、甲基紫精和强光照的胁迫下增加(Sunkar等2006), 而在臭氧和病菌的感染胁迫下减少(Jagadeeswaran等2009), 由此推断CSD2的表达并非严格受miR398的调控。本实验获得的MIR398过表达烟草植株中CSD的表达量受到一定程度的抑制, 通过对miR398在烟草中的靶基因预测, 我们了解到其靶基因是叶绿体CSD2, 它与miR398的碱基互补程度较低, 这与之前的研究一致, 为揭示CSD2与miR398的调控关系提供了更好的证据。

植物受到外界胁迫时会表现出产量降低甚至直接死亡, 这些问题都亟待解决。目前, 人们已通过多种技术手段得到了不同抗性的植株。Anu等(2015)利用VIGS技术沉默了辣椒的PR5基因后, 植株对疫霉菌的感病性增强; Guan等(2013)通过对CSD基因的突变获得了耐热性更强的植株。miR398是第一个被报道的、在植物逆境胁迫应答中下调表达的miRNA。为了提高烟草对外界胁迫的抗性, 以miR398与靶基因之间的负调控作用为依据, 我们可以利用基因沉默、敲除或突变等技术通过对烟草中miR398及其靶基因的改变, 解除miR398对靶基因的抑制作用从而改善植物的抗逆性。关于miR398在烟草中的作用机制及其有效利用还有待于进一步探索。

参考文献

- 丁艳菲, 王光钺, 傅亚萍, 朱诚(2010). miR398在植物逆境胁迫应答中的作用. 遗传, 32 (2): 129~134
- 胡宗利, 邓磊, 姚楠, 罗敏, 陈国平(2009). 番茄PR-1和PR-5基因的表达特性分析. 西南大学学报(自然科学版), 31 (8): 67~72
- 惠非琼, 彭兵, 楼兵干, 林福呈, 聂长春, 刘剑(2014). 印度梨形孢通过促进渗透调节物质的合成和诱导抗逆相关基因的表达提高烟草耐盐性. 农业生物技术学报, 22 (2): 168~176
- 鲁玉柱, 封振, 边黎颖, 谢虹, 鲁晓红, 梁建生(2011). 过表达抗miR398的OsmCSD2基因提高水稻的重金属抗性. 植物生理学报, 47 (11): 1064~1068
- 吕帝瑾, 赵佳媛, 陈婧, 钟扬, 南蓬(2013). 植物microRNA的研究进展. 植物生理学报, 49 (9): 847~854
- 任鹏举, 谢永丽, 张岩, 伍辉军, 高学文(2014). 枯草芽孢杆菌OKB105产生的surfactin防治烟草花叶病毒病及其机理研究. 中国生物防治学报, 30 (2): 216~221
- 孙超, 孟军, 栾雨时(2012). 基于支持向量机分类算法的番茄miRNA预测. 计算机工程与应用, 48 (14): 203~207
- 于力, 阎君, 张一鸣, 刘士辉, 张辉, 刘娜, 田守波, 姚永康, 朱为民(2015). 异源表达番茄LeMPK3基因提高烟草的抗低温胁迫能力. 植物生理学报, 51 (1): 79~87
- 张玉, 杨爱国, 冯全福, 蒋彩虹, 耿锐梅, 罗成刚(2012). 植物病程相关蛋白及其在烟草中的研究进展. 生物技术通报, (5): 20~24
- Anu K, Jessymol KK, Chidambareswaren M, Gayathri GS, Manjula S (2015). Down-regulation of *osmotin* (PR5) gene by virus-induced gene silencing (VIGS) leads to susceptibility of resistant *Piper colubrinum* Link. to the oomycete pathogen *Phytophthora capsici* Leonian. Indian J Exp Biol, 53 (6): 329~334
- Guan QM, Lu XY, Zeng HT, Zhang YY, Zhu JH (2013). Heat stress induction of *miR398* triggers a regulatory loop that is critical for thermotolerance in *Arabidopsis*. Plant J, 74 (5): 840~851
- Jagadeeswaran G, Saini A, Sunkar R (2009). Biotic and abiotic stress down-regulate miR398 expression in *Arabidopsis*. Planta, 229 (4): 1009~1014

- Luan YS, Wang WC, Liu P (2014). Identification and functional analysis of novel and conserved microRNAs in tomato. *Mol Biol Rep*, 41 (8): 5385~5394
- Luan YS, Cui J, Zhai JM, Li J, Han L, Meng J (2015). High-throughput sequencing reveals differential expression of miRNAs in tomato inoculated with *Phytophthora infestans*. *Planta*, 241 (6): 1405~1416
- Mittler R (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*, 7 (9): 405~410
- Sunkar R, Zhu JK (2004). Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16 (8): 2001~2019
- Sunkar R, Kapoor A, Zhu JK (2006). Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell*, 18 (8): 2051~2065
- Wang WC, Luan YS (2015). The advance of tomato disease-related microRNAs. *Plant Cell Rep*, 34 (7): 1089~1097
- Zhu C, Ding YF, Liu HL (2011). MiR398 and plant stress response. *Physiol Plant*, 143 (1): 1~9
- Zhang XM, Zhao HW, Gao S, Wang W, Katiyar-Agarwal S, Huang HD, Raikhel N, Jin HL (2011). *Arabidopsis* Argonaute 2 regulates innate immunity via miRNA393*-mediated silencing of a golgi-localized SNARE gene, *MEMB12*. *Mol Cell*, 42: 356~366