

## 高表达 miR396 小分子导致拟南芥花柱头弯曲

刘冬梅<sup>1,2</sup>, 杨凤玺<sup>1,2</sup>, 余迪求<sup>1</sup>

(1 中国科学院西双版纳热带植物园, 云南 昆明 650223; 2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要:** MicroRNAs (miRNAs) 是大小约 21 个碱基、内源、非编码的小分子 RNA。以拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) miR396 小分子为研究对象, 分别克隆到了 miR396 小分子的两个前体 (*MIR396a*, *MIR396b*), 得到了转基因植株。通过转基因植株的遗传学研究发现, 高表达 miR396 小分子导致转基因拟南芥的花柱头弯曲。花柱头的弯曲影响了角果的正常发育。另外, Northern 杂交结果表明转基因拟南芥花部位的 miR396 及其前体的表达量与对照相比显著增加。这些结果表明高表达 miR396 小分子可以导致拟南芥花柱头弯曲。

**关键词:** 拟南芥; miR396; 花柱头; 弯曲

中图分类号: Q 945

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700 (2009) 04-353-04

## Overexpression of miR396 miRNAs Caused Flower Stigma Curved in *Arabidopsis thaliana*

LIU Dong-Mei<sup>1,2</sup>, YANG Feng-Xi<sup>1,2</sup>, YU Di-Qiu<sup>1\*\*</sup>

(1 *Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China;*

2 *Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

**Abstract:** MicroRNAs (miRNAs) are ~21 nucleotide (nt), endogenous and encoding RNAs that play important regulatory roles in growth and development by targeting mRNAs for direct cleavage or translational repression in plants. To analyze the biological function of miR396, we placed two synthetic precursors, *MIR396a* or *MIR396b*, under the control of the enhanced Cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter in a plant transformation vector (pOCA30) and transformed the constructs into *Arabidopsis*. Genetic analysis showed that flower stigmas of 35S: *MIR396* transgenic *Arabidopsis* were curve and siliques of miR396 transgenic plants were abnormal. In addition, Northern blot analysis showed that the miR396 miRNAs and levels of *MIR396* precursor transcripts were significantly increased in transgenic *miR396* plants compared with control. These results strongly supported that miR396 played an important role in plant flower development.

**Key words:** *Arabidopsis thaliana*; miR396; Flower stigma; Curve

MicroRNAs (miRNAs) 是大小约 21 个碱基、内源、非编码的小分子 RNA (Jones-Rhoades and Bartel, 2004)。MicroRNAs 通过碱基互补诱导其靶 mRNA 的剪切或抑制其翻译 (Bartel, 2004)。一些研究表明 MicroRNAs 可以调控植物的生长发育。miR159 负调控 *MYB* 转录因子家族, 其高表达能

导致拟南芥雄性不育以及开花时间延迟 (Achard 等, 2004); miR319 通过剪切负调控 *TCP* 转录因子家族, 其高表达导致拟南芥叶形不规则、叶卷曲以及晚开花 (Palatnik 等, 2003); miR160 负调控 *ARF10*、*ARF16* 和 *ARF17*, 其高表达导致拟南芥根冠发育紊乱以及侧根增加 (Wang 等, 2005);

基金项目: 国家自然科学基金 (90408022)、云南省自然科学基金 (2004C0051M) 和国家高科技研究发展计划 (863 计划) (2006AA02Z129) 资助项目

通讯作者: Author for corresponsce; E-mail: ydq@xtbg.ac.cn

收稿日期: 2009-01-22, 2009-03-31 接受发表

作者简介: 刘冬梅 (1976-) 女, 在读博士研究生, 主要研究方向: 植物分子生物学。

miR164 通过剪切负调控 *NAC* 转录因子家族, 其高表达导致拟南芥器官融合以及侧根减少 (Mal-lory 等, 2004; Guo 等, 2005); miR172 通过翻译抑制负调控类似 *AP2* 转录因子, 其高表达导致拟南芥早开花, 花瓣缺失, 萼片转化为心皮 (Auker-man and Sakai, 2003; Chen, 2004)。

Jones-Rhoades and Bartel (2004) 通过生物信息学方法从拟南芥和水稻中发现了 92 个 microR-NA, 其中包括 miR396。他们通过 PCR、Northern blot 及 5'-RACE 等实验方法验证了 miR396 的存在, 并在幼苗、莲座叶、花和根中均有表达。同时预测了 miR396 可能的靶基因为 *Growth Regulation Factor (GRF)*, Rhodanase-like protein 和 Kine-sin-like protein B, 并通过 5'-RACE 验证了部分 *GRF (GRF1、GRF2、GRF3、GRF7、GRF8 和 GRF9)* 确实是 miR396 的靶基因。

本文以拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 为实验材料, 通过基因克隆的方法高表达 miR396 的两个前体, 并结合 Northern 杂交和形态学分析等方法发现高表达 miR396 可导致拟南芥花柱头弯曲。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

选用拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的生态型 Columbia 为实验材料。种子表面灭菌后均匀散布在 1/2 MS 培养基 (含 0.9% agar), 4℃ 春化 2 天, 转移到 28℃ 培养箱培养 5~7 天后移栽到土里。

### 1.2 质粒构建与农杆菌转化

包含 *MIR396a* 发夹结构的基因组序列 (544 bp) 作为合成前体序列。使用两个引物 (5'-TGCTGIAAAAGAAT-GACCCTT-3', 5'-AAACTCATAGACAGAAGTTAGGGTT-3') 进行 PCR (聚合酶链式反应) 获得这个序列, 然后克隆到 pUCm-T Vector (Sangon)。通过测序证实后再克隆到含 35S 启动子的高表达载体 (pOCA30) 上, 标记为 35S: *MIR396a*。通过相同方法获得 35S: *MIR396b*。

农杆菌转化按照 Clough and Bent (1998) 的花浸染法操作。

### 1.3 Northern 杂交

RNA 提取采用 Trizol reagent (Invitrogen) 法。使用 1.5% 甲醛-MOPS 琼脂糖凝胶分离 RNA 后, 转移到尼龙膜上。杂交温度为 68℃; 杂交液选用 PerfectHyb™ Plus buffer (Sigma-Aldrich)。探针通过 klenow fragment (Takara) 进行<sup>32</sup>P-dATP 标记。

关于小分子 RNA 杂交, 先将 20 μg 总 RNA 通过 15%

聚丙烯酰胺变性凝胶 (含 7 mol L<sup>-1</sup> 尿素) 进行分离, 然后转移到尼龙膜上。杂交温度为 35℃; 杂交液选用 PerfectHyb™ Plus buffer (Sigma-Aldrich)。探针选用 Terminal Deoxynucleotidy Transferase (Takara) 进行<sup>32</sup>P-dATP 标记。

## 2 结果

### 2.1 miR396 小分子的基本信息

miR396 小分子是 Jones-Rhoades and Bartel (2004) 通过生物信息学方法发现的。他们通过 PCR、Northern 杂交及 5'-RACE 等实验方法验证了 miR396 小分子的存在和表达, 即 miR396 基因在拟南芥中有两个位点, 分别位于 2 号染色体和 5 号染色体上。这两个位点产生的相应的 miR396 小分子, 即 miR396a (At2g10606) 和 miR396b (At5g35407), 只有一个碱基的差别 (图 1)。采用 PCR 技术, 我们从拟南芥基因组 DNA 之中扩增获得 miR396a 和 miR396b 前体序列, 通过生物信息学分析获得其二级结构见图 1。

通过 EST 序列分析方法发现 miR396 小分子在 15 个不同的物种中存在, 是高度保守的小分子, 并且其初始转录体和成熟的 miRNA 都是高

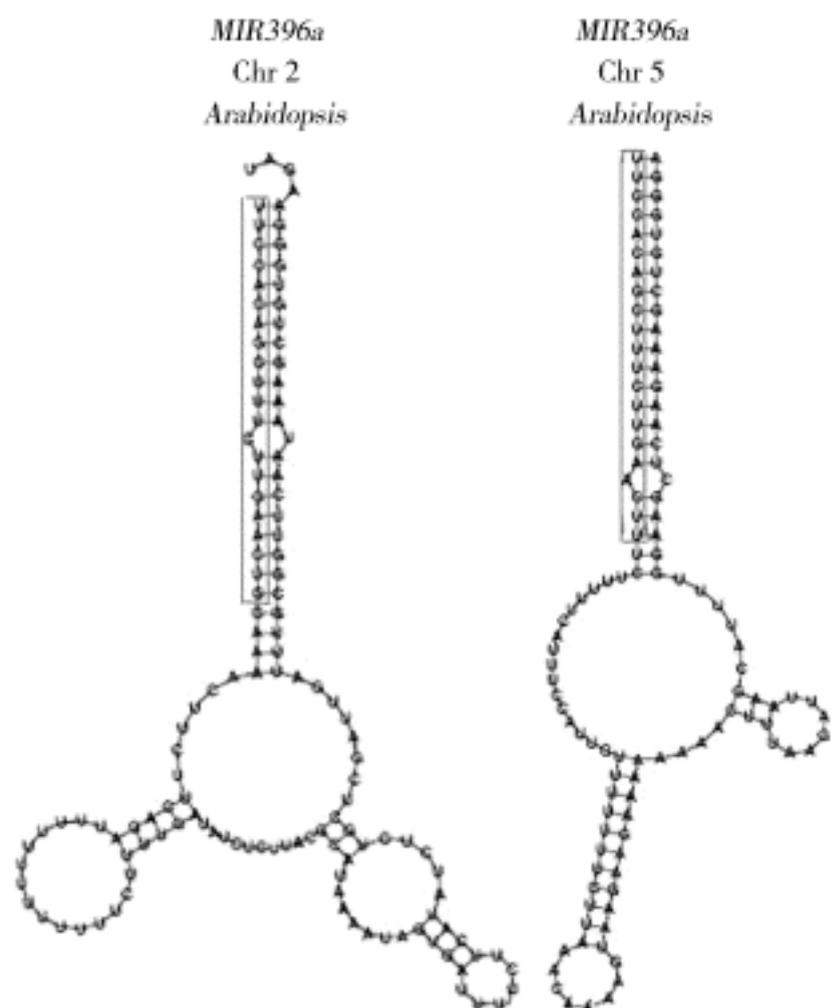


图 1 miR396 前体的二级结构

(<http://ma.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>)

Fig. 1 Secondary structures of miR396 precursors

度保守的，特别是成熟 miRNA 序列及其互补序列 (Zhang 等, 2006)。

## 2.2 基因克隆

采用 PCR 技术，我们从拟南芥基因组 DNA 之中扩增获得 miR396a 和 miR396b 前体序列，然后克隆到 pUCm-T Vector (Fermentas)。经测序证实是 miR396 的前体序列后克隆到含 35S 启动子的高表达载体 (pOCA30) 上，分别记作 35S: *MIR396a*、35S: *MIR396b*。

## 2.3 miR396 高表达转基因植株的表型

采用基因克隆的方法分别获得了 miR396 两个前体的拟南芥高表达质粒载体 (35S: *MIR396a*、35S: *MIR396b*) 并通过农杆菌介导法转入拟南芥植

株，收取成熟种子，筛选出转基因幼苗，移栽到相同配方的土壤里，并在相同的环境中生长。然后对其表型进行观察，发现转基因植株与野生型相比，花的花柱头出现弯曲表型 (图 2)，柱头弯曲的花发育成的角果也形态各异、不规则 (图 3)。

## 2.4 miR396 及其前体在高表达转基因植株中表达量显著增加

采用凝胶印迹杂交方法检测了 miR396 是否在转基因植株中被高表达。当 miR396 两个前体的拟南芥高表达植株 (35S: *MIR396a*、35S: *MIR396b*) 生长约 40 天时，收集花序提取总 RNA，分别采用小分子杂交、大分子杂交进行 miR396 及其前体的检测。结果发现 35S: *MIR396a* 转基因植



图 2 miR396 高表达转基因植株的花柱头弯曲

Fig. 2 The flower stigma curved in 35S: *miR396 Arabidopsis* plants



图 3 miR396 高表达转基因植株的角果形态不规则

Fig. 3 Abnormal siliques in 35S: *miR396 Arabidopsis* plants

株与 Vector 相比，miR396 及其前体 (*MIR396a*) 的表达量不同程度的明显增加 (图 4)，而且都增加了 10 倍以上；35S: *MIR396b* 转基因植株与 Vector 相比，miR396 及其前体 (*MIR396b*) 的表达量也增加了 15 倍以上 (图 4)。这表明 miR396 表达量的显著增加导致了 miR396 高表达转基因植株的花柱头弯曲。

## 3 小结

miR396 在 15 个不同物种中被发现，是高度保守的小分子，并且其初始转录体和成熟的 miRNA 都是高度保守的，特别是成熟 miRNA 序列及其互补序列，这暗示 miR396 可能在植物发育方面具有重要且保守的功能 (Zhang 等, 2005)。

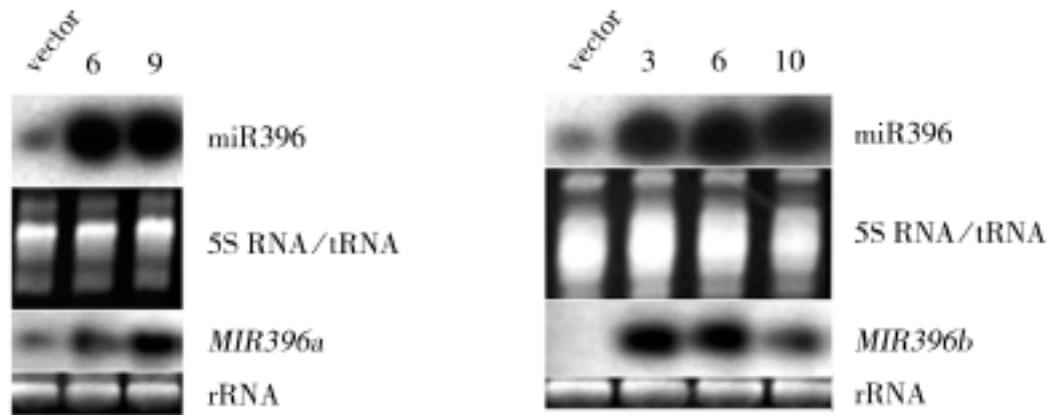


图 4 miR396 及其前体在 miR396 高表达植株的花中的表达量显著增加

Fig. 4 Expression level of *MIR396* (precursor) and miR396 in transgenic plants ( $T_1$ , 40 days old). For miRNA gel blots, 20  $\mu$ g of total RNA was used. Three replicated experiments were performed and the results were similar

研究发现 miR396 确实具有多方面且重要的功能, 例如 miR396 可以负调控拟南芥类神经酰胺酶基因的表达 (Liu 等, 2009)。本文论述了 miR396 参与拟南芥花柱头发育这一重要功能。

研究中发现, 在 miR396 高表达转基因植株的花器官中, miR396 及其前体的表达量都显著增加, 而 miR396 转基因植株的花柱头出现了弯曲的表型, 这说明 miR396 参与了拟南芥花柱头的正常发育, 至于参与的方式以及途径有待于进一步研究。另外, 我们还发现 miR396 转基因植株花柱头弯曲的程度还与环境的变化有关系, 这也有待于进一步研究。

### 〔参 考 文 献〕

Achard P, Herr A, Baulcombe DC *et al.*, 2004. Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA [J]. *Development*, 131: 3357—3365

Aukerman MJ, Sakai H, 2003. Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its *APETALA2*-like target genes [J]. *The Plant Cell*, 15: 2730—2741

Bartel DP, 2004. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 116: 281—297

Clough SJ, Bent AF, 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Journal*, 16: 735—743

Chen X, 2004. A microRNA as a translation repressor of *APETALA2*. *Arabidopsis* flower development [J]. *Science*, 303: 2022—2025

Liu DM (刘冬梅), Yi DQ (余迪求), 2009. miR396 negatively regulates expression of Ceramidase-like genes in *Arabidopsis* [J]. *Progress in Nature Science (自然科学进展)*, 19: 33—38

Guo HS, Xie Q, Fei JF *et al.*, 2005. MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor *NAC1* to downregulation auxin signals for *Arabidopsis* lateral root development [J]. *The Plant Cell*, 17: 1376—1386

Jones-Rhoades MW, Bartel DP, 2004. Computational identification microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA [J]. *Molecular Cell*, 14: 787—799

Mallory AC, Dugas DV, Bartel DP *et al.*, 2004. MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs [J]. *Current Biology*, 14: 1035—1046

Palatnik JF, Allen E, Wu X *et al.*, 2003. Control of leaf morphogenesis by microRNAs [J]. *Nature*, 425: 257—263

Wang JW, Wang LJ, Mao YB *et al.*, 2005. Control of root cap formation by microRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 17: 2204—2216

Zhang B, Pan X, Cannon CH *et al.*, 2006. Conservation and divergence of plant microRNA genes [J]. *The Plant Journal*, 46: 243—259