

草莓 microRNA 的 RT-PCR 鉴定

李 贺, 张志宏, 高秀岩, 刘月学, 黄飞飞

(沈阳农业大学园艺学院, 沈阳 110161)

摘要: 【目的】microRNAs (miRNAs) 在植物的生长发育过程中起着重要作用, 本研究旨在建立一种快速准确地鉴定草莓中保守 miRNA 的方法。【方法】以草莓叶片为试材, 在利用改进的 CTAB 法成功富集小于 150 bp 的小分子 RNA 的基础之上, 采用 3'端加接头、5'端和 3'端两端加接头、利用茎环等 3 种 RT-PCR 策略来检测鉴定草莓中保守 miRNA, 同时比较总核酸、总 RNA 和小分子 RNA 等不同种类的模板对利用茎环 RT-PCR 检测 miRNA 的影响。

【结果】对于植物中 20 种 miRNAs, 通过 3'端加接头方式鉴定出 7 种; 通过两端加接头方式鉴定出 1 种; 而利用茎环的方式鉴定出 15 种。分别以 3 种核酸为模板的茎环 RT-PCR 的扩增效果没有差异。【结论】总核酸的提取是最快速最简单的, 因此, 以总核酸为模板, 利用茎环 RT-PCR 是鉴定植物中 miRNA 的最简便快速而有效的方法, 这种方法的可行性已在苹果、葡萄等植物上得到验证。

关键词: MicroRNAs; RT-PCR; 草莓; 鉴定

Identification of MicroRNA in Strawberry by RT-PCR

LI He, ZHANG Zhi-hong, GAO Xiu-yan, LIU Yue-xue, HUANG Fei-fei

(College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161)

Abstract: 【Objective】microRNAs (miRNAs) play an important role in plant growth and development. The aim of this paper is to develop a quick method for exact identification of the conserved miRNAs from plants. 【Method】High quality small RNAs (less than 150 bases) were isolated from strawberry leaves with the modified CTAB method. Three kinds of RT-PCR methods, using 3' adaptor, using 5' and 3' adaptors and stem-loop primers, were compared. Three kinds of templates, total nucleic acid, total RNA and small RNAs were compared in identification of miRNAs with stem-loop primers. 【Result】For twenty miRNAs of plants, seven miRNAs were identified from strawberry plants by using 3' adaptor, only one miRNA was successfully identified with the method of 5' adaptor and 3' adaptor, while fifteen miRNAs were identified by using stem-loop primers. No difference was found in PCR fragments by using three kinds of nucleic acids as templates. 【Conclusion】Because the extraction of total nucleic acid was very simple and rapid, the suitable method for identification of the conserved miRNAs from plants with RT-PCR was to use stem-loop primers and total nucleic acid as template. This method had been approved on other plants, such as apple and grape.

Key words: microRNAs; RT-PCR; strawberry; identification

0 引言

【研究意义】microRNA (miRNA) 是一类来自真核生物自身基因组的非编码小分子 RNA, 长度多数为 19~25 nt^[1-4], 主要在转录后水平 (post-transcriptional gene silencing, PTGS) 上负向调节基因表达^[5-6]。越来越多的报道指出 miRNA 在植物的生长发育、对环境

条件的胁迫应答以及其它生理生化反应中均具有重要作用^[7-11], 因此, 拓宽研究物种, 快速准确地鉴定和系统地研究植物的 miRNA 意义重大。【前人研究进展】自 Reinhart 等于 2002 年率先从拟南芥小分子文库中获得 miRNA 以来^[12], 植物中已有大量的 miRNA 被鉴定^[13-14], 但它们并不是无处不在, 可能只在特定的组织和特定的时间才表达, 并且其在结构和

收稿日期: 2008-06-18; 接受日期: 2008-09-01

基金项目: 国家自然科学基金 (30671432)、教育部新世纪优秀人才支持计划 (NCET-07-0565)、沈阳农业大学青年教师科研基金资助项目 (2006215)

作者简介: 李 贺 (1978-), 女, 辽宁辽阳人, 博士, 研究方向为果树分子生物学。Tel: 024-88487392; E-mail: lihe1978721@163.com。通信作者张志宏, 河北张家口人, 教授, 博士, 研究方向为果树遗传育种及分子生物学。Tel: 024-88481010; E-mail: zhangz@syau.edu.cn

功能方面具有保守性。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,对于非模式植物则研究较少^[15-18]。目前,植物 miRNA 发现和鉴定的方法主要有 2 种:对于基因组已经解析的模式植物主要通过计算机来分析和预测^[19-21];而对于非模式植物,主要采用构建文库的策略^[12]。近来,国外的科研人员通过连线性接头或利用茎环 RT 引物等方式,克服了 miRNA 的长度仅有约 21 个核苷酸而 PCR 引物一般也在 20 个核苷酸左右的难题,利用 RT-PCR 技术成功地在动物组织中检测到 miRNA 基因的表达^[22-24],最近这种技术在拟南芥上也得到应用^[25]。【本研究切入点】草莓(*Fragaria × ananassa*)是一种无性繁殖的多年生草本植物,基因组信息研究较少,目前国内外未见任何关于草莓 miRNA 的报道。miRNA 在结构和功能方面的保守性特点及 RT-PCR 技术在检测 miRNA 基因表达上的成功经验,将为研究基因组信息较少的非模式植物中的 miRNA 提供重要参考。【拟解决的关键问题】本项研究旨在建立一套有效地提取和快速准确地鉴定草莓植株中保守 miRNAs 的方法,为进一步分析 miRNA 基因的表达奠定重要基础。

1 材料与方 法

1.1 植物材料

草莓栽培品种‘丰香’种植于沈阳农业大学草莓日光温室中,常规栽培管理。

1.2 试剂

T₄ RNA 连接酶(20 U·μl⁻¹),碱性磷酸酶(10 U·μl⁻¹),T₄ 多聚核苷酸激酶(10 U·μl⁻¹)购自 NEB 公司;dNTPs (2.5 mmol·L⁻¹),反转录酶 AMV (5 U·μl⁻¹),RNase 抑制剂(40 U·μl⁻¹),RNase-free DNase I (5 U·μl⁻¹),DL2000 DNA ladder, DNA 凝胶回收试剂盒,pMD19-T 载体购自 TaKaRa 公司,引物和连接头的合成由 TaKaRa 公司完成,使用浓度为 5 μmol·L⁻¹;Taq DNA 聚合酶(5 U·μl⁻¹),ATP,BSA,100 bp DNA ladder,50 bp DNA ladder 购自天为公司;其它药品为国产分析纯。

1.3 核酸提取方法

1.3.1 小分子 RNAs 的提取和富集 采用改进的 CTAB 法从草莓叶片中提取和富集小分子 RNAs。具体如下:(1)每个样品取 0.1 g 草莓幼嫩叶片在液氮中迅速研碎,转移到含有 600 μl CTAB 缓冲液(2% CTAB;100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl,pH 8.0;20 mmol·L⁻¹ EDTA;1.4 mol·L⁻¹ NaCl;2% β-巯基乙醇)的 1.5 ml 离

心管中,混匀后,65℃水浴 20 min。(2)4℃ 8 000 r/min 离心 10 min,上清液被转移到新的离心管中,用氯仿/异戊醇(24:1)抽提 2 次。(3)上清液再次被转移到新的离心管中,加入 1/4 体积的 10 mol·L⁻¹ LiCl,混匀后,-20℃沉淀 2 h。(4)4℃ 10 000 r/min 离心 10 min,弃上清,用 300 μl DEPC 水溶解沉淀,加入 50 μl 50% PEG8000 和 50 μl 5 mol·L⁻¹ NaCl,混匀后,冰浴 2 h。(5)4℃ 10 000 r/min 离心 10 min,上清液被转移到新的离心管中,加入 1/10 体积的 3 mol·L⁻¹ NaAc (pH 5.2)和 2.5 倍体积的无水乙醇,混匀后-70℃沉淀 1 h。(6)4℃ 10 000 r/min 离心 20 min,用 300 μl DEPC 水溶解沉淀,加入 3 μl RNase-free DNase I 和 1 μl RNase 抑制剂,37℃酶解 3 h。(7)用氯仿/异戊醇(24:1)抽提 1 次,上清液加入 1/10 体积的 3 mol·L⁻¹ NaAc (pH 5.2)和 2.5 倍体积的无水乙醇,混匀后-70℃沉淀 1 h。(8)4℃ 10 000 r/min 离心 20 min,用 20 μl DEPC 水溶解沉淀,然后在 2.5%的琼脂糖凝胶上检测小分子 RNA 的完整性,用 DU800 核酸蛋白分析仪(Beckman Coulter, USA)检测核酸的纯度。

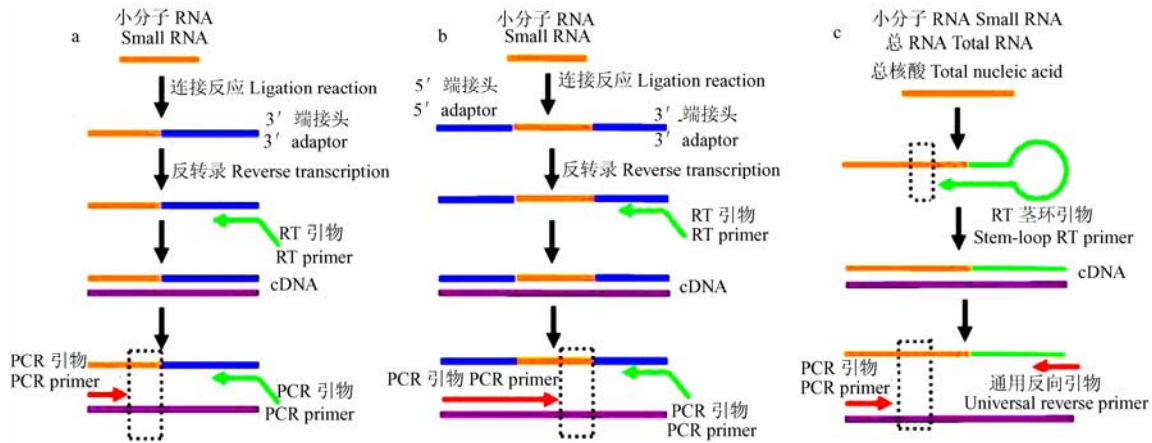
1.3.2 总核酸的提取 将 0.1 g 草莓幼嫩叶片在液氮中迅速研碎,转移到含有 600 μl CTAB 缓冲液(2% CTAB;100 mmol·L⁻¹ Tris,pH 8.0;20 mmol·L⁻¹ EDTA;1.4 mol·L⁻¹ NaCl;2% β-巯基乙醇)的 1.5 ml 离心管中,混匀后,65℃水浴 30 min。其次,4℃ 8 000 r/min 离心 10 min,上清液被转移到新的离心管中,用氯仿/异戊醇(24:1)抽提 2 次。再次,上清液被转移到新的离心管中,加入 1/10 体积的 3 mol·L⁻¹ NaAc (pH 5.2)和 2.5 倍体积的无水乙醇,混匀后-70℃沉淀 1 h。最后,4℃ 10 000 r/min 离心 20 min,用 50 μl DEPC 水溶解沉淀,然后在 1.0%的琼脂糖凝胶上检测总核酸的完整性,用 DU800 核酸蛋白分析仪(Beckman Coulter, USA)检测核酸的纯度。

1.3.3 总 RNA 的提取 总 RNA 的抽提采用 Chang 等^[26]的方法。

1.4 RT-PCR 鉴定方法

1.4.1 RT-PCR 策略及所使用的引物和连接头序列 采用 3'端加接头、5'端和 3'端两端加接头、利用茎环等 3 种 RT-PCR 策略来检测鉴定草莓中保守 miRNA (图 1),相应的引物设计参考 Lu 等^[22-23,27]的方法,见表 1~表 3 (只有鉴定出的 miRNAs 的引物序列列出)。

1.4.2 3'端加接头的 RT-PCR 方法检测 miRNAs (1) 脱磷酸化反应。脱磷酸化反应采用 0.2 ml PCR 管,反



a: 采用 3'端加接头克隆 miRNAs; b: 采用 3'端和 5'端两端加接头克隆 miRNAs; c: 采用茎环引物克隆 miRNAs。点点的方格区表示目标序列不包含在引物序列中
 a: Cloning miRNAs with 3' adaptor; b: Cloning miRNAs with 3' adaptor and 5' adaptor; c: Cloning miRNAs with stem-loop RT primers. The dotted box represents the target sequence not determined by the primers

图 1 miRNA 的 3 种 RT-PCR 策略

Fig. 1 Schemes of three kinds of RT-PCR methods for assay of miRNAs

表 1 采用 3'端加接头策略鉴定 miRNAs 的引物和接头序列 (图 1-a)

Table 1 Primers and 3' adaptor for identification of miRNAs with the method in Fig.1-a

名称 Name	序列(5'→3') Sequence (5' to 3')
Adaptor-50	pUUUcactattacgagtgactactcggcatcgtgcaagccatccttcX
RT for adaptor-50	cgcgatccgagaaggatcggtt
miR160 PCR primer	ccggaattctcctgctccctgt
miR172 PCR primer	ccggaattcagaatcttgatgatg
miR167 PCR primer	ccggaattctgaagctccagcat
miR159 PCR primer	ccggaattcttgattgaaggga
miR164 PCR primer	ccggaattctggagaagcaggga
miR168 PCR primer	ccggaattctgcttggtcaggt
miR157 PCR primer	ccggaattctgacagaagataga

p 为磷酸; 大写字母为 RNA; 小写字母为 DNA; X 为反向的胸腺嘧啶
 p: Phosphate; Uppercase: RNA; Lowercase: DNA; X: Inverted thymidine

表 2 采用 3'端和 5'端两端加接头策略鉴定 miRNAs 的引物和接头序列 (图 1-b)

Table 2 Primers and 3' and 5' adaptors for identification of miRNAs with the method in Fig.1-b

名称 Name	序列(5'→3') Sequence(5' to 3')
Adaptor-3'	pUUUaacgcgatccttcX
Adaptor-5'	tactaatcagctactAAA
RT primer	ttttctgcagaaggatcggttaa
miR167 PCR primer	aaacatggtactaatcagctactactaaatgaagctgcc

p 为磷酸; 大写字母为 RNA; 小写字母为 DNA; X 为反向的胸腺嘧啶
 p: Phosphate; Uppercase: RNA; Lowercase: DNA; X: Inverted thymidine

应体积为 20 μl, 其中包括 10 μl 小分子 RNA, 1 μl 碱性磷酸酶, 9 μl 碱性磷酸酶缓冲液, 37℃ 反应 60 min。

(2) 停止脱磷酸化反应通过 65℃ 水浴 15 min, 氯仿/异戊醇 (24 : 1) 抽提 1 次来完成。(3) 脱磷酸化产物的回收。向抽提的上清液中加入 1/10 体积的 3 mol·L⁻¹ NaAc (pH 5.2) 和 2.5 倍体积的无水乙醇, 混匀后 -70℃ 沉淀 30 min。之后 4℃ 12 000 r/min 离心 20 min, 用 5 μl DEPC 水溶解沉淀。(4) 3'端的连接反应在 0.2 ml PCR 管中进行, 反应体积为 20 μl, 其中包括 5 μl 脱磷酸化产物, 5 μmol·L⁻¹ 连接头(表 1)2 μl, 1 μl BSA, 2 μl ATP, 1 μl T₄ RNA 连接酶, 9 μl T₄ RNA 连接酶缓冲液, 37℃ 反应 60 min。(5) 停止连接反应通过 65℃ 水浴 15 min, 氯仿/异戊醇 (24 : 1) 抽提 1 次来完成。(6) 连接产物的回收。向抽提的上清液中加入 1/10 体积的 3 mol·L⁻¹ NaAc (pH 5.2) 和 2.5 倍体积的无水乙醇, 混匀后 -70℃ 沉淀 30 min。之后 4℃ 12 000 r/min 离心 20 min, 用 12 μl DEPC 水溶解沉淀。(7) RT-PCR 反应。反转录反应体积为 20 μl, 其中包括 12 μl 连接产物, 1 μl RT 引物(表 1), 1 μl dNTPs, 1 μl 反转录酶 AMV, 4 μl 反转录酶缓冲液和 1 μl RNase 抑制剂。在 0.2 ml 反应管中先加入连接产物, RT 引物和 dNTPs, 混匀后 65℃ 变性 5 min, 然后迅速放到冰水混合物中冷却, 之后再加入其它成分。16℃ 1 h, 42℃ 1 h, 最后 85℃ 反应 5 min 停止反转录反应。反转录结束后取 1 μl 进行 PCR 反应, 反应体

表 3 采用茎环引物鉴定 miRNAs 的引物序列 (图 1-c)
Table 3 Stem-loop RT primers and PCR primers for identification of miRNAs with the method in Fig. 1-c

名称 Name	序列(5'→3') Sequence(5' to 3')
miR160 stem-loop RT primer	ctcaactgggtgctgctggagtcggcgaattcagttgagtgccatac
miR165 stem-loop RT primer	ctcaactgggtgctgctggagtcggcgaattcagttgaggggggatg
miR172 stem-loop RT primer	ctcaactgggtgctgctggagtcggcgaattcagttgagatgcagca
miR167 stem-loop RT primer	ctcaactgggtgctgctggagtcggcgaattcagttgagtagatcat
miR159 stem-loop RT primer	ctcaactgggtgctgctggagtcggcgaattcagttgagtagagctc
miR164 stem-loop RT primer	ctcaactgggtgctgctggagtcggcgaattcagttgagtgccacgtg
miR168 stem-loop RT primer	ctcaactgggtgctgctggagtcggcgaattcagttgagttcccac
miR157 stem-loop RT primer	ctcaactgggtgctgctggagtcggcgaattcagttgaggtgctctc
miR156 stem-loop RT primer	ctcaactgggtgctgctggagtcggcgaattcagttgaggtgctcac
miR396 stem-loop RT primer	ctcaactgggtgctgctggagtcggcgaattcagttgagaagtcaa
miR393 stem-loop RT primer	ctcaactgggtgctgctggagtcggcgaattcagttgaggtcaatg
miR162 stem-loop RT primer	ctcaactgggtgctgctggagtcggcgaattcagttgagctggtatgc
miR169 stem-loop RT primer	ctcaactgggtgctgctggagtcggcgaattcagttgagtcgcaag
miR171 stem-loop RT primer	ctcaactgggtgctgctggagtcggcgaattcagttgaggtatattgg
miR171b stem-loop RT primer	ctcaactgggtgctgctggagtcggcgaattcagttgagctgatat
Universal reverse PCR primer	aactggtgctgctggag
miR160 PCR primer	acaactccagctgggtgctgctgctc
miR165 PCR primer	acaactccagctgggtgctgctgctc
miR172 PCR primer	acaactccagctgggtgctgctgctc
miR167 PCR primer	acaactccagctgggtgctgctgctc
miR159 PCR primer	acaactccagctgggtgctgctgctc
miR164 PCR primer	acaactccagctgggtgctgctgctc
miR168 PCR primer	acaactccagctgggtgctgctgctc
miR157 PCR primer	acaactccagctgggtgctgctgctc
miR156 PCR primer	acaactccagctgggtgctgctgctc
miR396 PCR primer	acaactccagctgggtgctgctgctc
miR393 PCR primer	acaactccagctgggtgctgctgctc
miR162 PCR primer	acaactccagctgggtgctgctgctc
miR169 PCR primer	acaactccagctgggtgctgctgctc
miR171 PCR primer	acaactccagctgggtgctgctgctc
miR171b PCR primer	acaactccagctgggtgctgctgctc

积 20 μl , 含 0.4 μl Taq DNA 聚合酶, 2 μl 10 \times PCR buffer, 1.6 μl MgCl_2 , 1 μl dNTPs, 1.6 μl RT 引物和 1.6 μl miR# PCR 引物 (表 1), 用水补足至 20 μl 。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。用含 EB (0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) 的 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.4.3 3'端和 5'端两端加接头的 RT-PCR 方法检测

miRNAs 采用 1.4.2 的方法完成 3'端的连接反应后, 进行 5'端的磷酸化反应, 20 μl 反应体积包括: 5 μl 连接产物, 4 μl ATP, 1 μl T₄ 多聚核苷酸激酶, 10 μl T₄ 多聚核苷酸激酶缓冲液。37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 60 min。停止磷酸化反应, 5'端的连接反应和 RT-PCR 反应, 使用表 2 中连接头和引物, 方法和反应程序同 1.4.2。

1.4.4 利用茎环 RT-PCR 方法来检测 miRNAs 采用表 3 中引物完成 RT-PCR 反应。RT 反应体积为 20 μl , 包括 12 μl 模板, 1 μl miR# RT 茎环引物 (表 3), 1 μl dNTPs, 1 μl 反转录酶 AMV, 4 μl 反转录酶缓冲液和 1 μl RNase 抑制剂。在 0.2 ml 反应管中先加入模板, 茎环 RT 引物和 dNTPs, 混匀后 65 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 然后迅速放到冰水混合物中冷却, 之后再加入其它成分。16 $^{\circ}\text{C}$ 30 min; 20 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 42 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 1 s, 60 个循环; 最后 85 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min 停止反转录反应^[24]。反转录结束后取 1 μl 进行 PCR 反应, 反应体积 20 μl , 含 0.4 μl Taq DNA 聚合酶, 2 μl 10 \times PCR buffer, 1.6 μl MgCl_2 , 1 μl dNTPs, 1.6 μl 通用 PCR 引物和 1.6 μl miR# PCR 引物 (表 3), 用水补足至 20 μl 。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 55 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。用含 EB (0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) 的 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.5 PCR 产物的克隆和测序

利用 DNA 凝胶回收试剂盒从琼脂糖凝胶中回收扩增片段, 与 pMD19-T 载体连接, 然后转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞。通过蓝白斑筛选 PCR 鉴定阳性克隆, 测序工作委托上海生工公司进行。结合 <http://www.sanger.ac.uk> 公布的 miRNA 序列对测序结果进行分析。

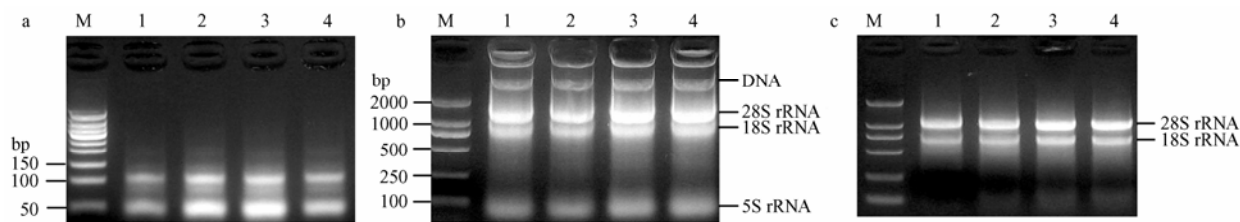
2 结果与分析

2.1 草莓植株中小分子 RNA、总核酸和总 RNA 的分离

采用改进的 CTAB 法成功地从草莓幼嫩叶片中分离出小分子 RNA, 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测结果表明: 富集的小分子 RNA 片段小于 150 bp (图 2-a), A260/A280 比值在 2.00~2.08, 这说明小分子 RNA 的质量较高。同时, 提取的总核酸和总 RNA 的 1% 琼脂糖凝胶电泳图谱中 28S 和 18S rRNA 谱带清晰 (图 2-b, 2-c), A260/A280 比值在 1.97~2.02。

2.2 3 种利用 RT-PCR 技术检测 miRNA 方法的比较

2.2.1 3'端加接头方式的 RT-PCR 方法 这种研究策略 (图 1-a) 要求在 3'端加 1 个连接头, 通过连接头序列设计 RT 引物反转录形成 cDNA, PCR 扩增时,



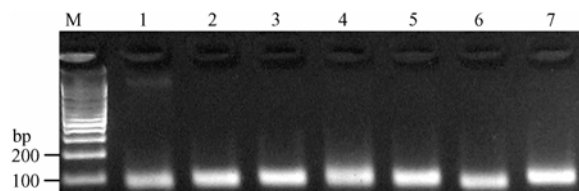
a: 小分子 RNA; b: 总核酸; c: 总 RNA。M: DNA ladder; 1~4: 草莓栽培品种 ‘丰香’
a: Small RNA; b: Total nucleic acid; c: Total RNA. M: DNA ladder; 1-4: Different samples of strawberry cv. Toyonoka

图 2 草莓幼嫩叶片中小分子 RNA、总核酸和总 RNA 的电泳图谱

Fig. 2 Electrophoresis of small RNA, total nucleic acid and total RNA extracted from strawberry young leaves

根据 miRNA 序列设计 PCR 5'端引物, 引物包括某一种 miRNA 5'端 15 个核苷酸, 3'端引物使用 RT 引物。这样扩增产物中约有 6 个核苷酸是不包括在引物中的 miRNA 靶序列, 根据 PCR 产物的测序结果来鉴定是否含有该种 miRNA。

以小分子 RNA 为模板, 对 miR168 等 20 种保守小 RNA 进行了扩增, 结果表明, 针对 miR168 等 7 种 miRNA 的引物扩增, 得到了大小约 92bp 的片段 (图 3), 对测序结果进行分析后发现, 扩增序列中均包含了接头序列、引物序列及完整的 miRNA 序列。采用该种策略, 成功地从草莓幼嫩叶片中鉴定出 7 种 miRNAs: miR168、miR159、miR160、miR164、miR167、miR157 和 miR172。



M: 100 bp DNA ladder (天为公司)。1~7: 依次是 miR168, miR159, miR160, miR164, miR167, miR157, miR172
M: 100bp DNA ladder (TIANWEI, China); 1-7: miR168, miR159, miR160, miR164, miR167, miR157, miR172, respectively

图 3 以小分子 RNA 为模板采用 3' 端加接头的 RT-PCR 产物
Fig. 3 RT-PCR products of miRNAs amplified from small RNA using the 3' adaptor

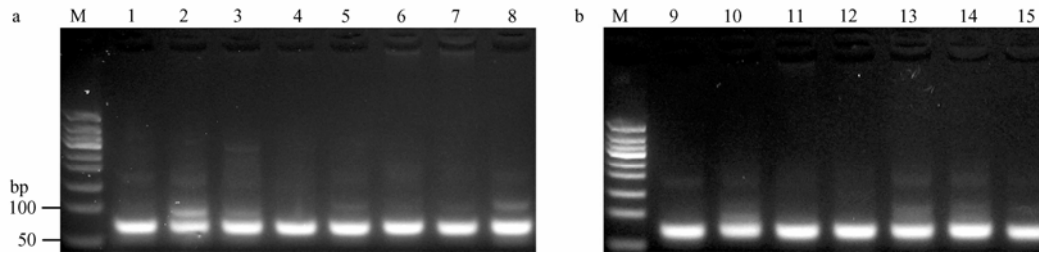
2.2.2 3'端和 5'端两端加接头的 RT-PCR 方法 这种研究策略 (图 1-b) 是根据 Elbashir 等^[27]提出的方法改进而成, 其特点是在 miRNA 的 3'端和 5'端各加上 1 个接头, 根据接头序列设计 RT 引物和 PCR 引物。本

研究中为了鉴定保守的 miRNA, 5'端 PCR 引物中包含 10 个要鉴定的 miRNA 的核苷酸序列, 这样扩增产物中约有 11 个核苷酸是不包括在引物中的 miRNA 靶序列。扩增产物的测序结果表明, 采用这种策略, 只有 miR167 被成功地从草莓幼嫩叶片中检测出来。

2.2.3 利用茎环的 RT-PCR 方法 该方法 (图 1-c) 的 RT 茎环引物的 3'端有 8 个核苷酸同 miRNA 的 3'端互补, 接下来的 7 个核苷酸与其自身 5'端互补。PCR 反应过程中, 3'端反向引物为与 RT 茎环引物部分序列完全一致的通用引物 (universal primer), 5'端 PCR 引物包含 10 个目标 miRNA 的 5'端核苷酸, 这样 miRNA 有 3 个核苷酸是不包括在引物序列中的。因此, 通过 PCR 产物的克隆测序来鉴定是否含有该种 miRNA。采用这种策略, 得到了大小约为 75 bp 的扩增片段 (图 4), 对测序结果进行分析后发现, 75 bp 序列中包含引物序列, 还包括了完整的 miRNA 序列。miR167, miR164, miR168, miR165, miR157, miR159, miR156, miR172 (图 4-a) 及 miR162, miR171b, miR396, miR393, miR169, miR160 和 miR171 (图 4-b) 等 15 种 miRNAs 成功地从草莓幼嫩叶片中鉴定出来。

2.3 不同性质的核酸为模板的茎环 RT-PCR

上述结果表明, 茎环 RT-PCR 是检测植物 miRNA 的最有效方法, 也是最简便快捷的方法。该方法使用茎环引物进行 RT 反应 (图 1-c), 不需要脱磷酸化、连接等反应, 明显简化 miRNAs 的检测步骤。为了进一步简化鉴定过程, 本文还比较了小分子 RNA、总 RNA、总核酸等不同性质的核酸模板对茎环 RT-PCR 的影响。结果表明 (图 5), 以小分子 RNA (图 5-a), 总核酸 (图 5-b) 和总 RNA (图 5-c) 为模板, 均获得了约 75 bp 的扩增片段, 测序结果也证明了扩增产物

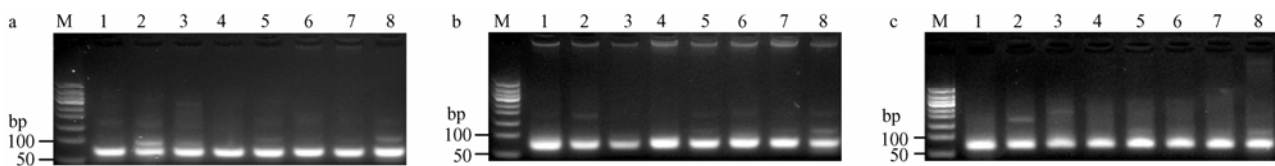


M: 50 bp DNA ladder; 1~15: 依次是 miR167, miR164, miR168, miR165, miR157, miR159, miR156, miR172, miR162, miR171b, miR396, miR393, miR169, miR160, miR171

M: 50 bp DNA ladder; 1-15: miR167, miR164, miR168, miR165, miR157, miR159, miR156, miR172, miR162, miR171b, miR396, miR393, miR169, miR160 and miR171

图 4 以小分子 RNA 为模板采用茎环引物的 RT-PCR 产物

Fig. 4 RT-PCR products of miRNAs amplified from small RNA using stem-loop primers



M: 50 bp DNA ladder (天为公司); 1~8: 依次是 miR167, miR164, miR168, miR165, miR157, miR159, miR156, miR172. a: 以小分子 RNA 为模板的扩增产物. b: 以总核酸为模板的扩增产物. c: 以总 RNA 为模板的扩增产物

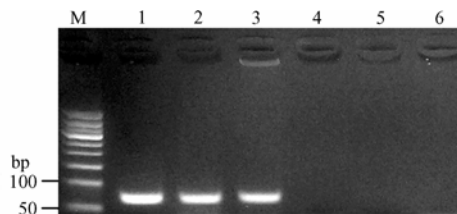
M: 50 bp DNA ladder (TIANWEI, China); 1-8: miR167, miR164, miR168, miR165, miR157, miR159, miR156 and miR172. a: Small RNA as templates. b: Total nucleic acid as templates. c: Total RNA as templates

图 5 以不同性质核酸为模板采用茎环引物的 RT-PCR 产物

Fig. 5 RT-PCR products of miRNAs amplified from different kinds of nucleic acids using stem-loop primers

中含有相应的 miRNA。为了明确总核酸中的 DNA 对 PCR 的扩增结果是否有影响, 使用茎环 miR157 引物进行 RT-PCR 扩增。结果表明(图 6), 以小分子 RNA (泳道 1), 总 RNA (泳道 2), 总核酸(泳道 3)

为模板, 均得到了预期的目的片段。而以总 DNA 为模板的 RT-PCR 反应没有得到任何扩增片段(泳道 4), 同时 RT 清水(泳道 5)和 PCR 清水(泳道 6)的对照也没有得到任何扩增片段。因此, 3 种性质的核酸对茎环 RT-PCR 检测 miRNA 的结果没有影响。



M: 50 bp DNA ladder (天为公司); 1~6: 依次是小分子 RNA 为模板; 总 RNA 为模板; 总核酸为模板; 总 DNA 为模板; RT 清水对照; PCR 清水对照

M: 50 bp DNA ladder (TIANWEI, China); 1-6: Small RNA as template; total RNA as template; total nucleic acid as template; total DNA as template; no-template control in RT; no-template control in PCR

图 6 以不同性质核酸为模板采用茎环引物扩增 miR157

Fig. 6 RT-PCR products of miR157 amplified from different kinds of nucleic acids using stem-loop primers

3 讨论

近年来, miRNA 倍受关注, 已成为科学研究的热点, 大量报道主要集中在 miRNA 种类及功能的鉴定上^[7-11], 但小分子 RNA 的富集是成功研究植物中 miRNA 的种类和基因功能的前提与基础, 尤其是针对非模式植物采用构建文库的策略来研究 miRNA^[27]。本文采用改进的 CTAB 法, 成功地从草莓幼嫩叶片中富集了小于 150 bp 的高质量的小分子 RNA (图 2-a), 其 A260/A280 在 2.00~2.08, 能够成功用于 RT-PCR 鉴定等后续研究。而现有的报道中多采用试剂盒, 如使用 mirVana RNA maker system(Ambion)^[19,24], Small RNA Gel Extraction Kit (TaKaRa) 等分离小分子

RNA, 也有使用 15%~20% 的变性聚丙烯酰胺凝胶^[3,27-28], 但相比改进的 CTAB 法而言, 价格昂贵, 步骤繁琐。

利用 RT-PCR 技术已成功地在动物组织中检测到 miRNA 基因的表达^[22-24], 但在植物上应用较少。本文在成功富集草莓小分子 RNA 的基础上, 系统比较了 3 种 RT-PCR 策略的扩增结果, 发现使用茎环引物获得了很好的结果, 鉴定出 15 种保守的 miRNAs (图 4), 并且与其它两种方法相比, 该方法没有脱磷酸化、连接等反应, 鉴定步骤简易。对于其它两种方法, 采用 3'端加接头鉴定出 7 种 miRNAs (图 3), 通过两端加接头, 只有 miR167 被鉴定出来, 分析原因可能是只采用乙醇沉淀的方法回收脱磷酸化产物、连接产物等的针对性和惟一性不强, 无法保障 RT-PCR 扩增时模板的准确性和惟一性, 也可能与茎环结构引物的自由能最小有关。因此, 茎环 RT-PCR 也是检测植物组织中 miRNA 基因表达的快速有效方法, 这与 Varkonyi-Gasic 等^[25]在拟南芥上得到的结论相似。

在构建 miRNA 文库和利用 Northern 杂交检测 miRNA 基因表达研究中, 多以富集的小 RNA 为模板^[29], 而在利用实时定量 PCR 检测 miRNA 基因表达的研究中, 有以小分子 RNA 为模板的^[22], 也有以总 RNA 为模板的^[24]。为了寻找简单、快速鉴定 miRNA 基因表达的方法, 本研究采用茎环引物的 RT-PCR 策略, 比较了总核酸、总 RNA 和小 RNA 等 3 种核酸对检测 miRNA 的影响, 扩增结果表明 3 种性质的核酸对茎环 RT-PCR 检测 miRNA 的结果没有影响。由于总核酸的提取最为简单和快速, 因此, 对于定性研究植物中保守的 miRNA, 以总核酸为模板是最快速有效的方法。目前, 采用这种方法已在木本果树苹果、藤本果树葡萄等其它植物以及草莓的某些器官, 如雄蕊、花瓣、萼片等上获得了成功 (数据本文未列出)。而对于定量分析植物中的 miRNA, 借助于 18S rRNA、 β -actin、GAPDH 等^[14,23,29]管家基因为内对照的情况下, 以总 RNA 为模板, 利用茎环引物的实时 RT-PCR 是一种很好的方法, 目前此项工作正在开展中。

4 结论

本研究建立了一套有效地提取和快速准确地鉴定草莓植株中保守 miRNAs 的方法, 利用茎环 RT-PCR 策略成功从草莓植株中鉴定出 15 种 miRNAs, 为进一步研究分析 miRNA 基因的表达奠定了重要基础。

References

- [1] Bartel D P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116: 281-297.
- [2] Llave C, Kasschau K D, Rector M A, Carrington J C. Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *The Plant Cell*, 2002, 14: 1605-1619.
- [3] Sunkar R, Zhu J K. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *The Plant Cell*, 2004, 16: 2001-2019.
- [4] Xie Z X, Allen E, Fahlgren N, Calamar A, Givan S A, Carrington J C. Expression of Arabidopsis MIRNA genes. *Plant Physiology*, 2005, 138(4): 2145-2154.
- [5] Park M Y, Wu G, Gonzalez-Sulser A, Vaucheret H, Poething R S. Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2005, 102(10): 3691-3696.
- [6] Xie Z X, Kasschau K D, Carrington J C. Negative feedback regulation of Dicer-Like1 in Arabidopsis by microRNA-guided mRNA degradation. *Current Biology*, 2003, 13: 784-789.
- [7] Aukerman M J, Sakai H. Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes. *The Plant Cell*, 2003, 15: 2730-2741.
- [8] Chen X M. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science*, 2004, 303: 2022-2025.
- [9] Lauter N, Kampani A, Carlson S, Goebel M, Moose S P. MicroRNA172 down-regulates glossy15 to promote vegetative phase change in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2005, 102(26): 9412-9417.
- [10] Mallory A C, Bartel D P, Bartel B. MicroRNA-directed regulation of Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *The Plant Cell*, 2005, 17: 1-16.
- [11] Millar A A, Gubler F. The Arabidopsis GAMYB-Like genes, MYB33 and MYB65, are microRNA-regulated genes that redundantly facilitate another development. *The Plant Cell*, 2005, 17: 705-721.
- [12] Reinhart B J, Weinstein E G, Rhoades M W, Bartel B, Bartel D P. MicroRNAs in plants. *Genes and Development*, 2002, 16: 1616-1626.
- [13] Dezulian T, Rimmert M, Palatnik J F, Weigel D, Huson D H. Identification of plant microRNA homologs. *Bioinformatics*, 2006, 22(3): 359-360.
- [14] Yao Y Y, Guo G G, Ni Z F, Sunkar R, Du J K, Zhu J K, Sun Q X. Cloning and characterization of microRNAs from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome Biology*, 2007, 8: 96.
- [15] Bonnet E, Wuyts J, Rouz  P, van de Peer Y. Detection of 91 potential

- conserved plant microRNAs in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* identifies important target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2004, 101(31): 11511-11516.
- [16] Floyd S K, Bowman J L. Ancient microRNA target sequences in plants. *Nature*, 2004, 428: 485-486.
- [17] Rhoades M W, Reinhart B J, Lim L P, Burge C B, Bartel B, Bartel D P. Prediction of plant microRNA targets. *Cell*, 2002, 10: 513-520.
- [18] Wang J F, Zhou H, Chen Y Q, Luo Q J, Qu L H. Identification of 20 new miRNAs from *Oryza sativa*. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(5): 1688-1695.
- [19] Adai A, Johnson C, Mlotshwa S, Archer-Evans S, Manocha V, Vance V, Sundaresan V. Computational prediction of miRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Research*, 2005, 15: 78-91.
- [20] Jones-Rhoades M W, Bartel D P. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular Cell*, 2004, 14: 787-799.
- [21] Rajewsky N, Sockci N D. Computational identification of microRNA targets. *Developmental Biology*, 2004, 267: 529-535.
- [22] Lu D P, Read R L, Humphreys D T, Battah F M, Martin D I K, Rashedi J E J. PCR-based expression analysis and identification of microRNAs. *Journal of RNAi and Gene Silencing*, 2005, 1(1): 44-49.
- [23] Chen C F, Ridzon D A, Broomer A J, Zhou Z H, Lee D H, Nguyen J T, Barbisin M, Xu N L, Mahuyakar V R, Andersen M R, Lao K Q, Livak K J, Guegler K J. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(20): 179-187.
- [24] Tang F C, Hajkova P, Barton S C, Lao K Q, Surani M A. MicroRNA expression profiling of single whole embryonic stem cells. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(2): 9-15.
- [25] Varkonyi-Gasic E, Wu R M, Wood M, Walton E F, Hellens R P. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods*, 2007, 3: 12.
- [26] Chang L, Zhang Z, Yang H, Li H, Dai H Y. Detection of strawberry RNA and DNA viruses by RT-PCR using total nucleic acid as a template. *Journal of Phytopathology*, 2007, 155: 431-436.
- [27] Elbashir S M, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21-and 22-nucleotide RNAs. *Genes and Development*, 2001, 15: 188-200.
- [28] Mallory A C, Reinhart B J, Bartel D, Vance V B, Bowman L H. A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2002, 99(23) 15228-15233.
- [29] Lu S F, Sun Y H, Shi R, Clark C, Li L G, Chiang V L. Novel and mechanical stress-responsive microRNAs in *Populus trichocarpa* that are absent from *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2005, 17: 2186-2203.

(责任编辑 曲来娥)