

植物 microRNA 及其抗胁迫作用机制研究进展

王艳芳¹, 赵彦宏^{1*}, 安泽伟², 王爱云¹, 张丽¹, 刘林德¹

(1. 鲁东大学生命科学学院, 山东烟台 264025; 2. 中国热带农业科学院橡胶研究所, 海南儋州 571737)

摘要 对 miRNA 的特点、作用机制、合成、主要研究技术及植物 miRNA 在抗胁迫方面的作用进行了综述。

关键词 植物 microRNA; 胁迫; 基因调控

中图分类号 S311 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)24-11395-02

Research Progress on Plant microRNAs and Its Mechanisms of Anti-stress Effect

WANG Yan-fang et al (College of Life Science, Ludong University, Yantai, Shandong 264025)

Abstract The characters, action mechanisms, maturations, searching methods of miRNA and the functions of miRNA in regulation of biotic and abiotic stress of plants were summarized.

Key words Plant microRNA; Stress; Gene regulation

microRNA (miRNA) 是真核生物中一类自身基因组内的非编码小 RNA, 长度约为 21 ~ 25 nt (核苷酸), 与靶基因 mRNA 结合后起调控作用。对 miRNA 的研究始于时序调控 RNA (stRNA), 自 1993 年在秀丽新小杆线虫中发现第 1 个 miRNA lin-4 以来, 研究人员已运用多种检测方法在人类、水稻、拟南芥、果蝇、小家鼠等许多生物物种中鉴别出 3 500 余个 miRNA。miRNA 广泛存在于动物、植物和微生物基因组中, 各种生物体基因组中的 miRNA 基因在数量上约占 1%。miRNA 主要通过两种机制, 即翻译抑制和转录切割, 以降低其靶基因编码的蛋白水平, 进而在生长、发育、增殖、分化和死亡各个过程中起调控作用。在植物中, miRNA 常与靶基因的编码序列结合, 且一般均为完全互补或个别碱基不配对互补, 导致切割降解, 进一步调控植物的生长发育或其他生理过程。

1 miRNA 的合成与特点

1.1 miRNA 的合成 miRNA 基因通常位于编码蛋白质的基因之间, 多以簇状形式集中在一起^[1-2]。一般, 内源 miRNA 基因转录 (很可能是通过 RNA 聚合酶) 首先产生 pri-miRNA, 然后在核内被加工成 pre-miRNA, 接着 pre-miRNA 被转运到核外, 在细胞质中被 Dicer 和 Ago 复合体加工成成熟的 miRNA, 成熟的 miRNA 与 Ago 蛋白形成 miR-gonate 核蛋白 (Ribonucleoprotein), 并结合其他蛋白 (如 Gemin3、Gemin4) 形成 miRNA。在植物中, miRNA 是在核内被加工的^[3]。

1.2 miRNA 的特点 与动物 pre-miRNA 相比, 植物 miRNA 的特点主要有: 植物 pre-miRNA 的茎-环二级结构较稳定, 长度变化也较大, 一般为 64 ~ 303 nt, 错配率较低; 植物 miRNA 与靶基因 mRNA 的编码区或非翻译区 (3' 或 5' UTR) 可几乎完全互补配对结合, 进而促使靶基因 mRNA 裂解。

2 miRNA 的检测方法

由于 miRNA 分子很小, 且在生物体内含量较低, 再加上表达的时空特异性, 因此, 在研究过程中易遇到 miRNA 因降

解而丢失, 或因其他 RNA 的降解而产生大量假阳性片段, 以及找不到 miRNA 的假阴性 (不表达或表达量低于检测水平的下限) 等困难, 因此这对相关研究造成一定的难度^[4]。鉴于此, 研究工作者根据需要创造了多种 miRNA 检测、定量的方法。目前, 常用的 miRNA 检测方法及其优缺点为: ① RNA 印迹。是检测 miRNA 的标准方法, 常用来验证其他 miRNA 检测方法的可靠性。这种方法的缺点是低通量, 并且在检测稀有 miRNA 时灵敏度不够^[5]。② Real-time PCR。反应的特异性较高, 可把所有的 miRNA 纳入单个的多元 RT-PCR 反应体系中, 但价格昂贵。③ miRNA microarray。能够检测组织特异的 miRNA, 试验的可重复率高。利用微芯片不仅可以检测 miRNA 的类型, 还可以对其进行定量。该方法也经常用于高通量的筛选 miRNA。④ RAKE (RNA-primed, array-based Klenow enzyme) assay。可以敏感特异地检测 miRNA, 适用于大量快速地筛选所有已知的 miRNA。⑤ miRNA profiling。该方法操作简单, 灵敏度高 (小于 0.05 amol), 可检测范围广 (0.2 amol ~ 2.0 fmol), 且可对 miRNA 进行定量检测。⑥ 小靶点定量 PCR (Small-target quantitative PCR, SQPCR)。适用于高通量地灵敏定量已证实的和推测出的 miRNA。随着对 miRNA 研究的不断深入, 检测、定量 miRNA 的方法越来越多。该选用何种方法检测 miRNA 或对其进行定量分析, 要结合具体的试验目的和各种检测方法的优缺点综合考虑。

3 植物 miRNA 的抗胁迫作用机制

植物为了适应各种环境, 在进化过程中形成适应各种生物和非生物环境胁迫的机制。如机械力、干旱、盐碱、低温等非生物胁迫可以在转录水平或转录后水平调控植物一些相关基因的表达, 使植物抵抗或适应这些胁迫。miRNA 在植物生长发育中具有极为重要的功能, 已知的与 miRNA 所对应的靶 mRNA 大多为一些调控发育的转录因子^[6-7]、调控抗逆性 (抗寒、抗旱、抗盐碱、抗缺磷、抗缺硫、抗氧化)^[8-9] 以及调控对激素信号 (ABA、Auxin) 响应的基因^[10]。miRNA 的作用对象涵盖很多基因的转录产物, 包括 F-box 因子、泛素连接酶、富含亮氨酸的蛋白、代谢过程酶类基因的 mRNA^[11]。

3.1 抗非生物胁迫 到目前为止, 植物 miRNA 抗非生物胁迫方面的研究较多。2004 年, Sunkar 和 Zhu 构建了拟南芥幼苗的干旱、盐碱、低温、脱落酸胁迫的 miRNA 文库。对 miR-

基金项目 中国橡胶研究所农业部重点实验室开放基金 (XJS200-8908); 鲁东大学科研基金项目 (LY20073303); 国家自然科学基金项目 (30800682)。

作者简介 王艳芳 (1975 -), 女, 山西中阳人, 博士, 讲师, 从事遗传学研究。* 通讯作者。

收稿日期 2009-04-20

NA 文库进行测序并分析,发现了 26 种新的 miRNA,其中的 24 种分属于 15 个以前未曾报道的基因家族,另外两种分别是 miR171 和 miR319 家族成员,这说明干旱、盐碱、低温胁迫或脱落酸(ABA)处理可诱导相关 miRNA 基因的表达^[12]。Jones-Rhoades 等也通过生物信息学预测和试验证实的方法,在拟南芥中找到只有在胁迫条件下才诱导表达的部分新的 miRNA^[7]。Zhang 等用 EST 序列分析技术发现,123 种受逆境胁迫诱导的含 miRNA 序列的 EST 基因簇,其中有 36 种(29%)EST 基因簇与微生物感染有关,25 种(19%)与温度胁迫有关,28 种(22%)与干旱胁迫有关,分别有 4%、3% 和 3% 的 EST 基因簇与营养缺乏、盐碱和氧化胁迫有关^[13]。

3.2 抗自身氧化胁迫 2006 年,Sunkar 等发现,拟南芥中 miR398 有抵抗环境引起的自身氧化胁迫的作用,miR398 的目的基因是两种与氧化胁迫高度相关的 Cu/Zn-SOD。miR398 通过与 Cu/Zn-SOD mRNA 开放阅读框的识别位点结合,直接降解其转录产物。miR398 的表达受氧化胁迫负调控,这是目前唯一被详细报道的受胁迫负调控的 miRNA^[14]。

3.3 抗生物胁迫 关于植物 miRNA 与抗生物胁迫的关系,近年来也有一些初步的探索。研究发现,植物病毒对植物的侵染与 miRNA 之间有互作关系,主要表现在植物病毒表达的蛋白(如 AC4、HC2Pro 等)作为转录后基因沉默抑制子,降低某些(如 miR159、miR165/166、miR171)具有调控植物发育功能的 miRNA 的积累,从而干扰植物细胞基因的正常表达,使植物发育表型不正常^[15-16]。Llave 通过信息学方法发现,植物中存在一类 miRNA 与多种植物病毒基因完全或不完全互补,推测出这类 miRNA 可通过切割病毒基因抑制病毒感染,但具体作用有待进一步的试验证实^[17]。

4 展望

近年来,虽然科研工作者对 miRNA 在植物抗胁迫方面的研究越来越多,但是对植物 miRNA 的研究刚刚起步,与 miRNA 在生长发育方面的研究相比仍较少,且主要集中在已测序的单子叶植物水稻和双子叶植物拟南芥、毛果杨等 3 种植物。模式植物的优点在于基因背景清楚及数据库资源丰富。今后随着研究的深入,将会发现更多的 miRNA,并对 miRNA 的代谢和调控途径也会有新的认识。关于非模式植物中 miRNA 在功能方面是否普遍存在,是否同样能够参与到抵抗胁迫中有待进一步深入研究。另外,虽然越来越多的

miRNA 正在或已经采用生化、生物信息学方法得到鉴别,但由于很多 miRNA 是从单个克隆中鉴别出来的,且具有组织特异性、时序性、非保守性和丰度较低。因此,有很多 miRNA 可能在分离和鉴定过程中被遗漏,而已鉴别出的只不过是众多 miRNA 中的少部分,因此寻找 miRNA 的工作仍须继续进行。

参考文献

- [1] AMBROS V. The functions of animal microRNAs [J]. Nature, 2004, 431: 350 - 355.
- [2] BARTEL B, BARTEL D P. MicroRNAs: at the root of plant development [J]. Plant Physiol, 2003, 132: 709 - 717.
- [3] NELSON P, KIRIAKIDOU M, SHARMA A, et al. The microRNA world: small is mighty [J]. Trends in Biochemical Sciences, 2003, 8: 534 - 540.
- [4] DUNCAN D, ESHOO M, ESAU C. Absolute quantitation of microRNAs with a PCR-based assay [J]. Anal Biochem, 2006, 359(9): 2682 - 2701.
- [5] 王旭丹. MicroRNA 检测方法的发展现状 [J]. 国际内科学杂志, 2007, 34(11): 679 - 682.
- [6] SUNKAR R, ZHU J K. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2004, 16(8): 2001 - 2019.
- [7] JONES R M, BARTES D P. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA [J]. Mol Cell, 2004, 14(6): 787 - 799.
- [8] CHIOU T J, AUNG K, LIN S L, et al. Regulation of phosphate homeostasis by microRNA in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2006, 18(2): 412 - 421.
- [9] FUJII H, CHIOU T J, LIN S L, et al. A miRNA involved in phosphate starvation response in *Arabidopsis* [J]. Curr Biol, 2005, 15(22): 2038 - 2043.
- [10] GUO H S, XIE Q, FEI J F, et al. MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factors NaCl to downregulation auxin signals for *Arabidopsis* lateral root development [J]. The Plant Cell, 2005, 17(5): 1376 - 1386.
- [11] 王波, 冯晓黎, 张富春. 植物中 microRNA 的合成及在发育和抗逆中的作用 [J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(3): 581 - 588.
- [12] SUNKAR R, ZHU J K. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2004, 16: 2001 - 2019.
- [13] ZHANG B H, PAN X P, WANG Q L, et al. Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis [J]. Cell Res, 2005, 15: 336 - 360.
- [14] SUNKAR R, KAPOOR A, ZHU J K. Post transcriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by down-regulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance [J]. Plant Cell, 2006, 18(8): 2051 - 2065.
- [15] KASSCHAU K D, XIE Z, ALLEN E, et al. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function [J]. Dev Cell, 2003, 4(2): 205 - 217.
- [16] CHELLAPPAN P, VANITHARANI R, FAUQUET C M. MicroRNA-binding viral protein interferes with *Arabidopsis* development [J]. Proc Natl Acad Sci, USA, 2005, 102(29): 10381 - 10386.
- [17] LLAVE C. MicroRNAs: more than a role in plant development [J]. Molecular Plant Pathology, 2004, 5(4): 361 - 366.

(上接第 11348 页)

灭绝等问题提供新的途径,也将为发展我国传统中医药事业做出突出贡献。

参考文献

- [1] 姜冬, 张浩洋, 王永辉, 等. 刺五加繁育技术研究进展 [J]. 中国林副特产, 2008, 47(2): 100 - 102.
- [2] SHOHAEL A M, CHAKRABARTY D, YU K W, et al. Application of bioreactor system for large-scale production of *Eleutherococcus sessiliflorus* somatic embryos in an air-lift bioreactor and production of eleutherosides [J]. J Biotechnol, 2005, 120(2): 228 - 236.
- [3] 邢朝斌, 陈正恒, 曹蕾, 等. 刺五加的组织培养与细胞工程进展 [J]. 中草药, 2005, 36(12): 1896 - 1899.
- [4] OSONO T, BHATTA B K, TAKEBA H. Phyllosphere fungi on living and

- decomposing leaves of giant dogwood [J]. Mycoscience, 2004, 45: 35 - 41.
- [5] 魏景超. 真菌鉴定手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [6] H·L 巴尼特, B·B 亨特. 半知菌属图解 [M]. 北京: 科学出版社, 1977.
- [7] 王利娟, 贺新生. 植物内生真菌分离培养的研究方法 [J]. 微生物学杂志, 2006, 26(4): 55 - 61.
- [8] 李长田, 李玉, 方渐明, 等. 东北红豆杉内生真菌的多样性 [J]. 吉林农业大学学报, 2004, 26(6): 612 - 614, 623.
- [9] 杨丽珊, 黄耀坚, 郑忠辉, 等. 红树植物内生真菌的种群动态及生物活性 [J]. 厦门大学学报, 2006, 45(5): 95 - 99.
- [10] 杨敬芝, 李建北, 张东明, 等. HPLC 法测定不同产地的刺五加中刺五加苷 B 和 E 含量 [J]. 中药材, 2008, 28(8): 669 - 670.
- [11] 张晶, 刘芳芳, 薛起, 等. HPLC 法测定刺五加不同部位刺五加苷 B、E 含量 [J]. 药物分析杂志, 2008, 28(12): 2018 - 2020.