

大豆 *gma-miR1508a* 靶基因预测及功能分析

李永光¹, 艾佳¹, 王涛¹, 金龙国², 邱丽娟², 李文滨¹

(1. 东北农业大学大豆生物学教育部重点实验室/东北农业大学农业部东北大豆生物学与遗传育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘要: microRNA (miRNA) 是生物中广泛分布的、内源性的、由 21 ~ 25 个核苷酸大小的非编码单链小分子 RNA。miRNA 与靶基因 mRNA 具有互补关系, 能够介导降解靶基因和转录后水平的基因沉默, 引起目的基因表达的下调。通过利用 PlantCARE、PMRD、BAR 等数据库对 *gma-miR1508a* 启动子顺式调控元件和靶基因进行了生物信息学分析, 启动子分析结果表明 *gma-miR1508a* 含有多种非生物胁迫响应元件, 其表达受 ABA、低温、干旱等胁迫诱导。利用 PMRD 软件预测获得 7 个 *gma-miR1508a* 的靶基因, 分别参与了细胞凋亡、开花调控、逆境胁迫、细胞壁修饰等调控, 最终通过拟南芥同源基因分析获得了 Glyma10g03840.1、Glyma16g27800.1、Glyma17g07280.1 等 5 个与低温反应相关的候选靶基因。

关键词: 大豆; miRNA; 启动子; 靶基因

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2014.04.0479

The Target Genes Prediction and Analysis of *gma-miR1508a*

LI Yong-guang¹, AI Jia¹, WANG Tao¹, JIN Long-guo², QIU Li-juan², LI Wen-bin¹

(1. Chinese Education Ministry's Key Laboratory of Soybean Biology & Agricultural Ministry's Northeast Areal Key Laboratory of Soybean Biology and Genetic Breeding, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: microRNA (miRNA) is widely distributed RNA regulatory genes, endogenous and 21-25nt noncoding single-stranded small molecule RNA. miRNA has a complementary relationship with its target gene mRNA, and mediates the degradation of target genes. The transcriptional gene silencing causes the down-regulation of the expression of the target gene. In the present study, the promoter and the target gene of *gma-miR1508a* gene were predicted by bioinformatics methodology in PlantCARE, PMRD and BAR databases. Analysis results showed that many important abiotic stress cis-acting regulatory elements were found in the promoter sequence and gene expression may induce by ABA, low temperature and drought stresses. Seven *gma-miR1508a* target genes were identified by PMRD software, which involved in cell apoptosis, regulation of flowering, stress responses, cell wall modification. Finally, Glyma10g03840.1, Glyma16g27800.1, Glyma17g07280.1 totally five of them may be the target genes of *gma-miR1508a* under low temperature stress.

Key words: Soybean; miRNA; Promoter; Target gene

microRNA (miRNA) 是生物中广泛分布、内源性的、由 21 ~ 25 个核苷酸大小的非编码单链小分子 RNA 调控基因, 是由具备特征性发卡环二级结构前体转录加工而形成的, 其对动植物转录后基因的表达调控起关键作用^[1]。现在很多实验室采用分子生物学结合生物信息学的方法开展对 miRNAs 的研究工作, 研究手段具体有以下几个方面: 基因组实验、顺向遗传学、逆向遗传学分析法和靶基因的预测及验证等。miRNA 能够降解其靶基因, 在基因表达过程中起负调控作用, 并且能抑制靶基因在转录过程中或转录后水平上的表达, 因此可以通过研究 miRNA 靶基因的功能进而判断 miRNA 在生物体内的功能, 同时也可通过对 miRNA 启动子区域顺式作

用元件进行分析来推断其表达特点^[3-4]。目前 miRNA 的靶基因主要是通过生物信息学与实验验证相结合的方法得到的^[5], psRNATarget 是植物中预测 miRNA 靶基因的常用软件。miRNA 的启动子研究是通过预测启动子区域并分析其所包含的作用元件, 进而推测 miRNA 所具有的相关功能。利用 PlantCARE, PLACE 等数据库分析作用元件^[6-7], 从而进一步了解 miRNA 在基因调控网络中的作用。

gma-miR1508a 是从低温诱导的大豆幼苗小分子 RNA 文库中获得的上调表达 miRNA。本研究利用数据库对 *gma-miR1508a* 启动子顺式调控元件和靶基因进行生物信息学分析, 以期为进一步解析 *gma-miR1508a* 的功能奠定基础。

收稿日期: 2014-03-13

基金项目: 抗逆转基因大豆新品种培育 (2014ZX08004-002)。

第一作者简介: 李永光 (1984-), 男, 博士, 助理研究员, 主要从事大豆生物技术研究。E-mail: yongguangli@neau.edu.cn。

通讯作者: 李文滨 (1958-), 男, 博士, 教授, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: wenbinli@neau.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 *gma-miR1508a* 基本信息的获得

通过 miRNA 数据库(miRBase)获得 miRNA 序列信息,网址: <http://www.mirbase.org/> (Release 20; June 2013)。

1.2 *gma-miR1508a* 基因启动子的分析方法

在 Phytozome 中取 *gma-miR1508a* 前体序列的上游 1 500 bp 作为启动子分析区域 (<http://www.phytozome.com>)。使用在线软件 TSSP 预测启动子中的转录起始位点 (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=tssp&group=help&subgroup=promoter>) 和 TATA-box 进一步确定启动子的正确性。启动子的顺式作用元件的分析采用 PlantCARE 数据库进行分析 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)^[6-7]。

1.3 *gma-miR1508a* 的靶基因预测及分析方法

通过植物 miRNA 在线数据库 PMRD 查找出在大豆基因组中的 *gma-miR1508a* 靶基因 (<http://bioinformatics.cau.edu.cn/PMRD>), 并通过 BAR 数据库在线分析拟南芥中的同源靶基因在低温胁迫下的表达特点筛选 *gma-miR1508a* 参与低温反应的候选靶基因 (<http://bar.utoronto.ca/welcome.htm>)^[8-12]。

2 结果与分析

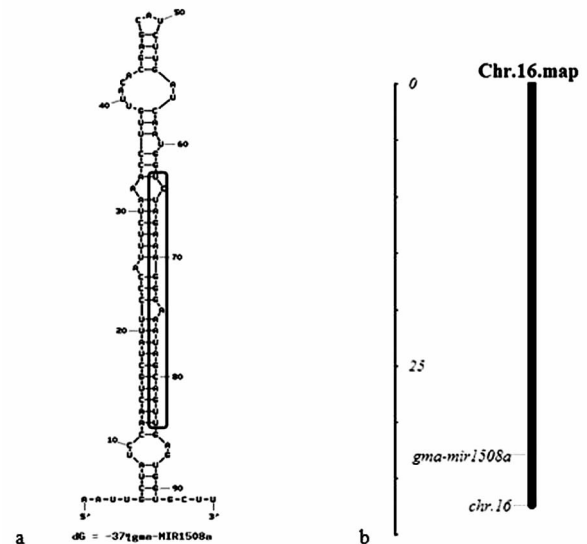
miRNA 的生物学功能预测主要通过基因的表达调控和其作用的靶基因的功能来分析。本研究中 *gma-miR1508a* 是从低温逆境胁迫筛选获得的上调表达 miRNA。因此,对于 *gma-miR1508a* 的功能分析,主要通过其启动子区域序列中的低温等逆境相关反应元件和其靶基因可能参与的低温逆境反应展开研究。

2.1 大豆 *gma-miR1508a* 的序列信息

gma-miR1508a 前体长度为 95 bp,定位在 16 号染色体上。*gma-miR1508a* 前体序列的茎环结构见图 1,方框为成熟序列。大豆 *gma-miR1508a* 前体序列为: AAUUGCUAUCCAACUGCUAUUCCCAUUUC UAAACCUUGUACACGAGCAUCUUGAUCAAUGG UCUAGAAAGGGAAAUAGCAGUUG AGUGGUGCUU (粗线处为成熟序列)。

2.2 *gma-miR1508a* 的启动子分析

通过对 *gma-miR1508a* 的前体序列在 Phytozome 上比对,选取了 *gma-miR1508a* 的基因组 5' 端上游 1 500 bp 序列作为启动子分析区域。通过 TSSP 分



a: *gma-miR1508a* 前体茎环结构; b: *gma-miR1508a* 染色体定位。

a: Pre-*gma-miR1508a* stem-loop structure; b: Position of *gma-miR1508a*.

图 1 *gma-miR1508a* 前体茎环结构及染色体定位

Fig. 1 Pre-*gma-miR1508a* stem-loop structure and position

析 *gma-miR1508a* 的转录起始位点(TSS)是以 A 开始,并在转录起始位点的上游 30 bp 处存在一个 TA-TA-Box,从而确定了启动子区域。通过植物启动子的顺式作用元件在线分析软件 plantCARE,可知启动子包含的作用元件个数及其功能,如表 1 所示。在 *gma-miR1508a* 的启动子区域有与抗逆、光及激素相关应答的作用元件。与抗逆有关的作用元件包括低温、干旱和热等;与激素有关的作用元件包括 ABA、乙烯、赤霉素和生长素等。由启动子顺式作用元件分析结果可推测,*gma-miR1508a* 参与低温、干旱和 ABA 等激素应答反应。

2.3 *gma-miR1508a* 靶基因的预测及分析

2.3.1 *gma-miR1508a* 靶基因预测 通过植物 miRNA 在线数据库 PMRD 查找出在大豆基因组中的 *gma-miR1508a* 靶基因,分析标准是与其靶基因的错配不超过 3 个碱基,共获得 7 个靶基因^[12]。*gma-miR1508a* 在拟南芥的同源靶基因功能注释见表 2。由于这 7 个靶基因的功能未知,进行同源基因的功能注释,注释后发现靶基因 Glyma17g07280.1 在拟南芥中的同源基因 AT4G25810 具有木葡聚糖转移酶的作用,与碳水化合物代谢有关,参与细胞壁的伸长及可塑性修饰的功能;靶基因 Glyma15g02010.1 是一种寡肽转运体,能够将寡肽从胞外转运到胞内,参与多种逆境响应;靶基因 Glyma10g03840.1 能够参与核小体组装,位于细胞核

表 1 *gma-miR1508a* 上游区域的顺式作用元件Table 1 Stress-related elements in the upstream regions of *gma-miR1508a*

元件 Elements	个数 Numbers	功能 Function	位置 Location/bp
5' UTR	3	非翻译区	-1219, -110, -115
TATA-box	6	启动子核心元件	-1302, -1264, -1133, -812, -794, -30
CAAT-box	6	启动子与增强子应答元件	-1154, -1080, -992, -863, -589, -165
CAT-box	1	分生组织表达	-1184
CCAAT-box	2	MYB 结合位点	-759, -672
LTR	2	低温响应元件	-921, -549
ABRE	2	ABA 响应元件	-57, +71
MBS	2	干旱诱导 MYB 结合位点	-44, +100
TCA-element	1	水杨酸响应元件	+109
HSE	1	热响应元件	+134
AE-box	1	光响应元件	-804
ERE	1	乙烯响应元件	-934
GARE-motif	1	赤霉素响应元件	-119
TGA-element	1	生长素响应元件	-583

在 TSS 的上游记为“-”;在 TSS 的下游记为“+”。

Upstream of TSS marked with “-”;downstream of TSS marked with “+”.

表 2 *gma-miR1508a* 靶基因功能表Table 2 The function of *gma-miR1508a* target genes

靶基因 Targets	同源基因 Homologous genes	功能 Functions
Glyma09g07290.1	AT1G12700	具有解旋酶的活性,ATP 结合,PPR 家族蛋白
Glyma09g09300.1	AT3G04220	跨膜受体的活性,核苷酸结合,细胞凋亡
Glyma10g03840.1	AT1G06760	参与核小体组装,位于细胞核,转录抑制 DNA 结合
Glyma14g36390.1	AT5G48250	CO-LIKE,负调控 constans 及 FT,SOC1
Glyma15g02010.1	AT1G52190	寡肽转运体,将寡肽从胞外转运到胞内,参与多种逆境响应
Glyma16g27800.1	AT1G12775	PPR 家族蛋白
Glyma17g07280.1	AT4G25810	木葡聚糖转移酶(碳水化合物代谢),参与细胞壁的伸长及可塑性修饰(木葡聚糖的裂解和聚合)

内,转录抑制 DNA 结合。Glyma16g27800.1 是属于 PPR 家族蛋白,PPR(pentatricopeptide repeat)蛋白家族在植物细胞质雄性不育、核质间信号传递和逆境胁迫等过程中有重要的作用。如参与拟南芥抗氧化过程、水稻抵抗低温过程等发挥着关键的作用^[13]。

2.3.2 *gma-miR1508a* 参与低温反应的靶基因预测

对 *gma-miR1508a* 靶基因的拟南芥同源基因进行低温反应功能分析,利用功能基因组在线分析数据库 BAR(Bio-Array Resource) 分别获得拟南芥同源靶基因在低温胁迫下的表达。由于 *gma-miR1508a* 受低温诱导上调表达,因此,靶基因被其降解后表

达应下调,负响应低温胁迫,即靶基因低温胁迫后表达量下降。同源靶基因低温胁迫下的表达情况见图 2。由图 2 可知,Glyma09g07290.1 同源靶基因在低温胁迫下上调表达,与 *gma-miR1508a* 靶基因低温下调的特征不符,推测其并非真正靶基因,不受 *gma-miR1508a* 调控;Glyma09g09300.1 同源基因受低温胁迫基因表达量下调不显著;Glyma10g03840.1, Glyma14g36390.1, Glyma15g 02010.1, Glyma16g27800.1, Glyma17g07280.1 这 5 个同源靶基因均受低温胁迫不同程度下调表达,符合 *gma-miR1508a* 靶基因参与低温应答特征。

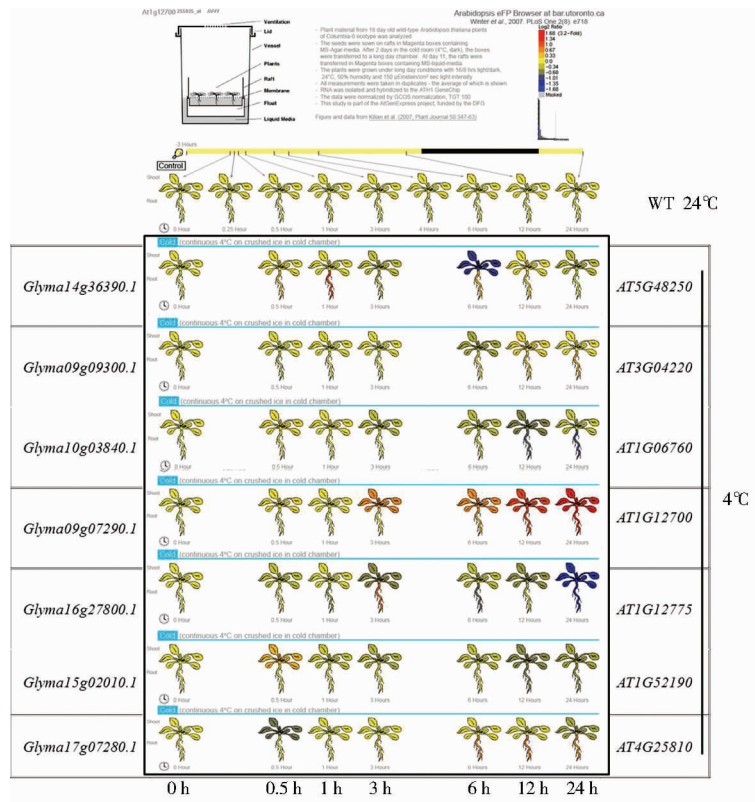


图2 拟南芥同源靶基因在4°C低温胁迫下的基因表达

Fig. 2 Expression of target genes under low-temperature treatment (4°C)

3 讨论

研究从启动子元件和靶基因两方面对 *gma-miR1508a* 的功能进行了预测和分析。*gma-miR1508a* 启动子区域转录起始位点和顺式作用元件的分析可以间接地获得 *gma-miR1508a* 的表达特性。在转录起始位点上游的 -921 和 -549 bp 位置有 2 个 LTR (low temperature response) 响应元件, -57 和 +71 bp 位置有 2 个 ABRE (ABA response element) 响应元件, 同时还存在多个干旱反应元件。说明 *gma-miR1508a* 可以通过上游调控元件来感受胁迫信号参与低温、干旱、ABA 应答反应, 使 *gma-miR1508a* 在低温、ABA 等胁迫下表达量增加。另外一方面, 对于 *gma-miR1508a* 作用的靶基因的分析是研究 miRNA 功能的关键。通过 PMRD 软件分析得到 7 个靶基因候选靶基因, 这些靶基因分别参与了细胞凋亡、开花调控、逆境胁迫、细胞壁修饰等。本研究利用拟南芥同源基因的表达数据重点分析了响应低温反应的候选靶基因, 根据 *gma-miR1508a* 的作用特点初步确定了 5 个响应低温反应的靶基因, 但要明确真正作用的靶基因, 还需要裂解位点验证、靶基因表达分析等试验进一步证实。

参考文献

[1] Bartel D P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.

[2] Molly M, Artemis G. MicroRNA promoter analysis[J]. Plant MicroRNAs Methods in Molecular Biology, 2010, 592: 149-161.

[3] Pandey S P, Krishnamazhari A. Computational analysis of plant RNA Pol-II promoters[J]. Biosystems, 2006, 83: 38-50.

[4] Molly M, Vesselin B, Ventsislav R. MicroRNA promoter element discovery in *Arabidopsis* [J]. RNA, 2006, 12: 1612-1619.

[5] Krek A. Combinatorial microRNA target predictions [J]. Nature Genetics, 2005, 37: 495-500.

[6] Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M. Plant cisacting regulatory DNA elements (PLACE) database [J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27: 297-300.

[7] Lescot M, Dehais P, Thijs G. PlantCARE: a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences [J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30: 325-327.

[8] Griffiths-Jones S. miRBase: tools for microRNA genomics [J]. Nucleic Acids Research, 2007, 1(36): 154-158.

[9] Krüger J, Rehmsmeier M. RNAhybrid: microRNA target prediction easy fast and flexible [M]. Nucleic Acids Research, 2006, 34: 451-454.

[10] Rehmsmeier M. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes [J]. RNA, 2004, 10: 1507-1517.

[11] Takaya S, Pal S. MicroRNAs targeting and target prediction [J]. New Biotechnology, 2007, 23(3): 243-248.

[12] Zhang B H, Pan X P, Edmund J S, et al. Identification of soybean microRNAs and their targets [J]. Planta, 2008, 229(1): 161-182.

[13] Maragkakis M, Alexiou P, Papadopoulos G, et al. Accurate microRNA target prediction correlates with protein repression levels [J]. BMC Bioinformatics, 2009, 10(1): 295.