

一种适合大豆 MicroRNA 鉴定的 RT-PCR 方法

刘永鑫¹, 韩英鹏¹, 常 玮¹, 邹 权², 郭茂祖², 李文滨¹

(¹东北农业大学大豆研究所, 大豆生物学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030; ²哈尔滨工业大学, 计算机科学与技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要: MicroRNAs (miRNAs) 是一类调控真核基因转录后表达的非编码小分子 RNA。绝大多数 miRNAs 由计算机预测得到, 其存在与否及时空分布还不清楚。因此建立高效、敏感和特异的检测方法, 是探明 miRNAs 在多种组织中时空调控的基础和前提。研究以 Lau 等和 Shi 等的方法为基础设计方案, 采用通用反转录引物, 以大豆幼叶、老叶、根、茎组织为研究材料, 对预测的、且 Sanger Institute 公布的 miR156a 进行扩增以检测扩增效率和准确性。经比较, 该方法具有反转录引物通用、成本低, 操作简单, 可快速、敏感、高通量地同时比较一种组织中多个 miRNAs, 也可比较多个组织中 miRNA; 且该方法比 Northern Blot 和 Microarray 需要的 RNA 量少得多。

关键词: 大豆; MicroRNA; RT-PCR; 鉴定

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9841 (2009)04-0600-05

A RT-PCR Method Suitable for MicroRNA Identification of Soybean

LIU Yong-xin¹, HAN Ying-peng¹, CHANG Wei¹, ZOU Quan², GUO Mao-zu², LI Wen-bin¹

(¹Soybean Institute, Northeast Agricultural University; Chinese Education Ministry's Key Laboratory of Soybean Biology, Harbin 150030, Heilongjiang; ²Department of Computer Science and Technology, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001, Heilongjiang, China)

Abstract: The microRNAs (miRNAs) are a newly identified class of small non-coding RNA, which regulate post-transcriptional gene expressing in eukaryote. Most miRNAs are predicted through the computer, the presence/absence and the spatial/temporal of miRNAs still unclear. It is important for the establishment of efficient, sensitive and specific detection methods to detect miRNAs in different organism or period. In this study, the protocol derived from Lau et al. and Shi et al. was used to detect miR156a, predicted and released by Sanger Institute, in old or young leaf, root, and shoot for verifying this method. By comparison, this method is low cost, simple, fast, and sensitive, common for primer of RT-PCR, which could identify a number of miRNAs in the same organism and compare miRNAs from different organism. Furthermore, this method need less RNA, in comparison with Northern Blot and Microarray.

Key words: Soybean; MicroRNA; RT-PCR; Identification

MicroRNAs (miRNAs) 是一类大约 22bp 的单链非编码 RNA, 广泛存在于真核生物中, miRNAs 在个体发育的不同时期或不同组织有不同的表达模式。因此, miRNAs 在发育和分化中起着重要的调控作用。miRNA 参与发育和分化调控过程中, 先转录成没有特定结构的前体 (primary miRNA, pri-miRNA), 再由 RNase III 酶 Droscha 在细胞核内加工, 产生 60~200 个核苷酸的发夹状前体 miRNA (pre-miRNA), 然后进入胞浆后, 由胞浆内的一种 RNase III 酶 Dicer 加工并产生成熟的单链 miR-

NA, 成熟的单链 miRNA 渗入 RNA 诱导的沉默复合物 (RNA induced silencing complex, RISC) 中, 引导 RISC 作用于特定 mRNA 的 3' 非翻译区 (Untranslated region, UTR), 进而降解靶 mRNA, 从而在转录后水平调控基因的表达^[1,2]。研究表明: 一种 miRNA 可调控多个 mRNAs, 多个 miRNAs 也可共同作用于同一种 mRNA^[3]。miRNA 对生物的多种功能, 包括生长发育、细胞增值、细胞凋亡、胁迫响应、癌症等方面都起着重要的调控作用。越来越多的研究表明: miRNA 具有重要的生物学意

收稿日期: 2009-01-16

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 目标导向资助项目 (2006AA10ZF1Z1); 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 重点资助项目 (2006AA100104-4)。

作者简介: 刘永鑫 (1987-), 男, 硕士研究生, 研究方向为大豆生物技术、大豆生物信息学。

通讯作者: 李文滨, 教授, 博士生导师。E-mail: wenbinli@yahoo.com。

义^[4]。

在研究相对成熟的人类基因组中,已经鉴定的 miRNAs 约占人类基因组的 1%,调控着大约 30%~50% 人类基因的表达^[5]。目前,共有 8619 条 miRNAs 收录于 miRBase Database: Release 12.0 (<http://microrna.sanger.ac.uk/>),其中拟南芥 miRNAs 有 206 种,水稻 miRNAs 有 374 种,大豆 miRNAs 却只有 70 种。

目前,绝大多数 miRNAs 由计算机预测得到,其存在与否及时空分布还不清楚,而建立高效、敏感和特异的检测方法,是探明 miRNAs 在多种组织中时空调控的基础和前提。目前,鉴定 miRNA 主要有 4 种方法:1. 直接克隆;2. 基于基因组学的生物信息学预测;3. Northern 杂交 (Northern blotting) 或芯片 (Microarray) 直接鉴定;4. 已知靶向基因序列后,人工构建的内含子 miRNA^[6]。直接克隆方法采用建立 miRNAs 文库,大量平行测序,这种方法成本高、工作量大,又受到了表达丰度的限制,一般只能鉴定特定组织中表达量较高的 miRNAs,有较高的假阴性率或缺失率^[7]。生物信息学方法是以大量已知序列,如全基因组序列、表达序列标签 (expressed sequence tag, EST)、基因组测定序列 (genomic survey sequences, GSS) 等为基础进行 miRNAs 预测,这种方法尽管成本低,但假阳性率较高^[8]。Northern blotting^[9-10] 和 Microarray^[10-11] 等方法,这些基于分子杂交的方法敏感性低,成本高且需要大量 RNA。而 RT-PCR 方法 (图 1) 通用 (既可检测 miRNAs 前体又可检测成熟体)、灵敏和可靠,是目前检测 miRNAs 的一种主要的方法。

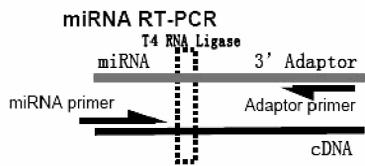


图 1 miRNA RT-PCR 原理简图

Fig. 1 The sketch map of miRNA RT-PCR principle

目前,已发表 5 种 RT-PCR 方法用于检测 miRNAs^[7,12-15],但其实验步骤复杂且成本较高,在综合 Shi 等^[14]检测植物 miRNAs 的接头设计方案和 Lau 等^[7]文库测序法的基础上,进行了简化和改进,以期建立一种适合大豆 MicroRNA 鉴定的 RT-PCR 方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 大豆品种东农 42 日龄 30 d 幼叶、老叶、根、茎组织,液氮速冻保存,待用。

1.1.2 序列数据 邹权等^[16-17]采用 RNA 折叠算法预测的大豆 miRNAs 共 103 条,其中包括 Sanger 中心,miRBase 中 microRNA 数据库 (<http://microrna.sanger.ac.uk/>) 已公布的 70 种大豆 miRNAs 序列。

1.2 方法

1.2.1 大豆总 RNA 提取 采用 Invitrogen 公司的 Trizol 试剂盒 (15596-026) 提取大豆四种组织 (幼叶、老叶、根、茎) 中的总 RNA,琼脂糖凝胶电泳方法检测 RNA 完整性,并混合建立较丰富的 RNA 文库,分光光度法估算浓度。

1.2.2 接头、引物的设计 miRNA 3' 端接头设计: 5'-PO4-UUUCACTAGCACGAGCTCGCTACGCTCCTACTC

GGCATTATGTACGCTAACT-PO4-3'^[11],由上海超世生物科技有限公司合成。引物包括逆转录引物 (RT-primer),和基因特异引物 (gene-specific primer, GSP),以及 Tm 值与 GSP 相近的接头通用引物 (adaptor general primer, AGP),以下引物由南京金思特科技有限公司合成。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称 Name	引物序列 Primer sequences
RT-primer	5'-GACCACGAGTTAGTTAGC-3'
AGP	5'-GACCACGAGTTAGTTAGC-3'
GSP156	5'-TGACAGAAGAGAGTGAGC-3'

1.2.3 miRNA 3' 端接头的连接 总 RNA 11 μL 与 3 端接头 2 μL (20 μM) 均匀混合,80 $^{\circ}\text{C}$ 下处理 2 min 后置于冰水混合物中冷却。配制反应体系:DEPC 处理水 16 μL 、10 \times T₄ RNA 连接缓冲液 (BSA-free) 5 μL 、BSA (0.1%) 4 μL 、T₄ RNA 连接酶 (40 U \cdot μL^{-1}) 2 μL ,总 RNA 和 3' 端接头的混合物 13 μL ,40% PEG#6000 溶液 10 μL ,共计 50 μL 。6 $^{\circ}\text{C}$ 反应 16 h,加入 2 μL 0.5M EDTA 终止反应;70 $^{\circ}\text{C}$ 下处理 10 min 以灭活连接酶,之后置于冰中保存。PEG#6000 可以催化提高目的片段的连接效率。需要注意的是,配制反应体系时需按照以下顺序:无 RNA 酶污染的水 \rightarrow 10 \times T₄ RNA 连接缓冲液 \rightarrow 0.1% BSA \rightarrow 总 RNA 和 3' 端接头,否则当 BAS 加入到缓冲液

中时,产生大量白色沉淀,从而影响反应体系稳定^[18]。

1.2.4 cDNA 的合成、PCR 反应、胶回收及测序
逆转录采用 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 试剂盒,逆转录采用合成的特异引物,具体反应体系和过程参考说明书。PCR 反应扩增目的片段,采用递减 PCR (Touch-down PCR, TD-PCR),程序为 94℃ 预变性 3 min 后,94℃ 变性 30 s,62℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,12 个循环 (touch down PCR),94℃ 变性 30 s,50℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,28 个循环,循环结束后 72℃ 延伸 8 min,然后 4℃ 保存。产物经 4% 琼脂糖电泳检测,PCR 产物回收采用小量 DNA 片段快速回收试剂盒 (博大泰克, B 型),操作具体按说明书。回收

片段与 pMD-18T 载体连接,转化大肠杆菌 DH5 α , PCR 鉴定的阳性克隆送上海生工测序。

2 结果与分析

2.1 miRNA 前体结构分析

大豆已知的 miRNAs 前体及成熟体,多数由生物信息学方法预测,并没有经试验检测,选取 Sanger 中心发布的、在大豆多个器官存在的 gma-156 作为研究材料,来验证本研究方法的有效性和准确性。

从预测的 miRNAs 随机选取 gma-156 做为参照,验证本方法的有效性。准确预测 miRNAs 前体是有效挖掘 miRNAs 成熟体的一个前提,只有准确地鉴定 miRNAs 前体,才能有效检测 miRNAs 成熟体。

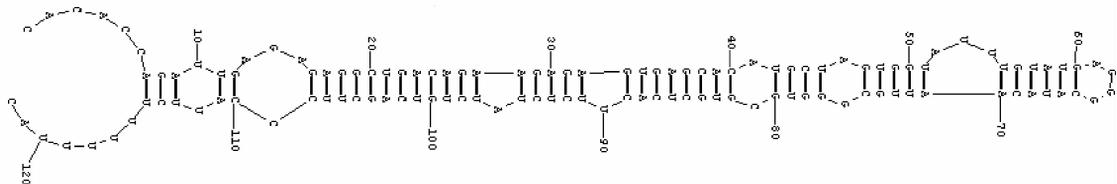


图 2 miR-156a 前体结构

Fig.2 The structure of pre-miR156a

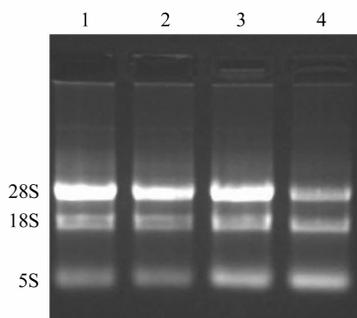
mi-156a 前体结构如图 2,mi-156a 成熟体序列位于 21-40 碱基之间,与其互补链只有两个碱基错配,互补情况良好,折叠自由能 $-55.4 \text{ KJ} \cdot \text{mol}^{-1}$,符合 miRNA 前体特点。

2.3 PCR 产物检测

PCR 产物经电泳检测明显,目的片段 85 bp 左右,与估计值预算值 85 bps (miRNA 21 bp 左右加接头序列 64 bp) 相吻合,验证了该方法的有效性。

2.2 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量

提取到高质量的、完整的总 RNA 是有效检测 miRNAs 成熟体的保证,由图 3 可知,提取的总 RNA,有三条清晰的带 28S、18S、5S,无明显拖尾,且 28S 亮度基本为 18S 亮度的 2 倍,则表明 RNA 较完整,没有被降解。

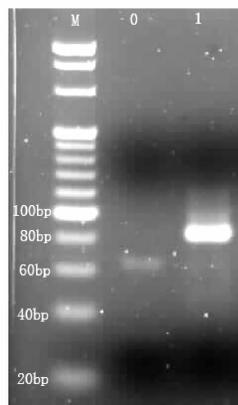


1. 幼叶 2. 老叶 3. 根 4. 茎

1. Young leaves 2. Old leaves 3. Root 4. Stem

图 3 RNA 电泳检测图

Fig.3 RNA gel electrophoresis map



M. 20bp Ladder Marker, 0. 对照; 1. mi-156
M. 20bp Ladder Marker, 0. Control; 1. mi-156

图 4 PCR 产物电泳图

Fig.4 PCR reaction electrophoretogram

2.4 测序结果分析

测序结果分析得到 gma-mi156a 的序列与 Sanger-miRBase 数据库 (<http://microrna.sanger.ac.uk/>) 中大豆公布的 gma-mi156a 完全相同 (图 5),证明该方法的

有效性,即验证同一 miRNAs 家族中的亚型。

mi-156 引物序列: **TGACAGAAGAGAGTGAGC**

3'-adaptor (64bp) : 5'-PO₄-UUUACTAGCACGAGCTCGCTACGCTCACTACTCGGCATTA
TGTACGCTAACT-PO₄-3'

1 ATT**TGACAGA AGAGAGTGAG C**ACTCTCACT AGCACGAGCT CGCTACGCTC ACTACTCGGC

61 ATTATGTACG CTA**ACTAACT** CGTGGTCAAT

gma-mi156a 序列: 5'-TGACAGA AGAGAGTGAG CAC-3'

ATT GAC CAC G A G T T A G T T A G C G T A C A T A A T G C C G A G T A G T G A G C G T A G C G A G C T C G T G C T A G T G A G A G T G C T C A C T C T C T C T G T C A A A T

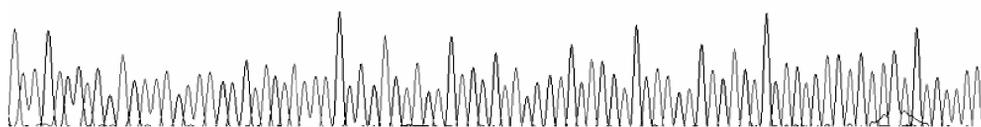


图 5 mi-156 的测序结果

Fig. 5 Result of mi-156 sequence

3 讨论

GSP 引物设计时应注意要尽可能使所有 GSP 都具有相近的 T_m 值,以便提高检测 miRNAs 的效率。结果显示:根据 miRNAs 中 GC 含量多少,来适当地增加或减少引物长度使 T_m 值相接近;对于那些 GC 含量较低的 miRNAs,只能通过降低 T_m 值来使 GSP 都具有相近的 T_m 值;但 miRNAs 的序列特别短,有时无法设计出与通用引物有近似退火温度的高产率引物,在这种情况下只能通过控制 AGP 长度以配合 GSP 的退火温度,以达到良好的效果。

接头序列设计要求与大豆基因组序列没有同源性或同源性较低,以降低或避免检测的噪音,且接头要有较理想引物结合位点,以用于逆转录和 PCR 反应;接头 5'要有三个 RNA 基因且磷酸化,这样能够提高接头与 miRNA 的 3'端连接效率,3'的磷酸化能够防止接头本身自环化^[1-2,7]。

miRNA 的 RT-PCR 目的片段只有 80 bp 左右,通常扩增效率低。结果显示:采用不同退火温度的接头与 GSP 组合,选择退火温度相近的引物,并进行递减 PCR 取得了良好的效果。

Lau 等^[7]的方法是目前最经典的 RT-PCR 方法,采用两端加接头和通用引物扩增,采用大量平行测序法鉴定 miRNA,能够准确得到 miRNA 的成熟体,具有较高的可信度。但其操作过程繁琐,且需大量测序,一般实验室无法开展。Chen 等^[12]采用 Taqman 探针实时定量 RT-PCR 法特异的 miRNA 进行扩增,Raymond 等^[13]采用引物延伸 RT-PCR 法也是采用基因特异的引物进行反转录,这两种方法除了需要合成每个 miRNA 特异的引物,还需要合成每

个 miRNA 特异的反转录引物来检测,Chen 等^[12]的方法还需要每个 miRNA 特异的探针,成本很高。在研究中,参考 Lau 等^[7]和 Shi 等^[14]的设计方案,采用的通用反转录引物、成本低,操作简单,可快速、敏感、高通量地同时比较一种组织中多个 miRNAs,也可比较多个组织中 miRNAs;该方法比 Northern Blot 和 Microarray 需要的 RNA 量少得多^[15]。

参考文献

- [1] Shao-Yao Ying. Micro RNA protocols [M]. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2006.
- [2] Rossi J J, Hannon G J. MicroRNA 研究方法 [M]. 北京:科学出版社, 2008. (John J Rossi, Gregory J Hannon. MicroRNA methods [M]. Beijing: Science Press, 2008.)
- [3] Grad Y, Aach J, Hayes G D, et al. Computational and experimental identification of *C. elegans* microRNAs [J]. Molecular Cell, 2003, 11(5): 1253-1263.
- [4] Ambros. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing [J]. Cell. 2003, 113: 673-676.
- [5] Alvarez G I, Miska E A. MicroRNA functions in animal development and human disease [J]. Development, 2005, 132 (21): 4653-4662.
- [6] 王芳, 余佳, 张俊武. 小 RNA (MicroRNA) 研究方法 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2006, 22(10): 722-779. (Wang F, Yu J, Zhang J W. Advances in study methods on MicroRNAs [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2006, 22(10): 722-779.)
- [7] Lau P, Hudson L, Murashov A K, et al. MicroRNA and siRNA cloning method [J]. Science, 2005, 294: 858-862.
- [8] 赵东宇, 王岩, 梁艳春, 等. 生物信息学中的 MicroRNA 预测研究 [J]. 吉林大学学报 (信息科学版), 2008, 26(3): 276-280. (Zhao D Y, Wang Y, Liang Y C, et al. Advances of MicroRNA prediction in bioinformatics [J]. Journal of Jilin University (Information Science Edition), 2008, 26(3): 276-280.

- [9] Fujii H, Chiou T J, Lin S I, et al. A miRNA Involved in phosphate-starvation response in arabidopsis[J]. *Current Biology*, 2005, 15: 2038-2043.
- [10] Senthil S, Yan F, Ramanjulu S, et al. Novel and nodulation-regulated microRNAs in soybean roots[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9:160 doi:10.1186/1471-2174-9/160.
- [11] Zhang B H, Pan X P, Edmund J S, et al. Identification of soybean microRNAs and their targets [J]. *Planta*, 2008, DOI 10.1007/s00425-008-0818-x.
- [12] Chen C, Ridzon D A, Broomer A J. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33:e179.
- [13] Raymond C K, Roberts B S. Simple, quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of microRNAs and short-interfering RNAs [J]. *RNA*, 2005, 11:1737-1741.
- [14] Shi R, Chiang V L. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR [J]. *Biotechniques*, 2005, 39:519-525.
- [15] 张旗, 何湘君, 潘秀英. RNA 加尾和引物延伸 RT-PCR 法实时定量检测 microRNA [J]. *北京大学学报(医学版)*, 2007, 39(1): 78-82. (Zhang Q, He X J, Pan X Y. Real-time quantification of microRNAs by RNA-tailing and primer-extension RT-PCR [J]. *Journal of Peking University (Healthy Sciences)*, 2007, 29(1):78-82.)
- [16] 邹权, 郭茂祖, 张涛涛. RNA 二级结构预测方法综述[J]. *电子学报*, 2008, 36(2):332-338. (Zou Q, Guo M Z, Zhang T T. A review of RNA secondary structure prediction algorithms [J]. *Acta Electronica Sinica*, 2008, 36(2):332-338.)
- [17] 张涛涛, 郭茂祖, 邹权. 参数序列比对算法研究[J]. *生物信息学*, 2008, 6(2):74-77. (Zhang T T, Guo M Z, Zou Q. Research of parametric sequence alignment algorithm [J]. *China Journal of Bioinformatics*, 2008, 6(2):74-77.)
- [18] 郑晓飞. RNA 实验技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 15-16. (Zheng X F. *RNA experimental technical manuals* [M]. Beijing: Science Press, 2004: 15-16.)

(上接第 587 页)

- [31] Panthee D R, Kwanyuen P, Sams C E, et al. Quantitative trait loci for β -conglycinin (7S) and glycinin (11S) fractions of soybean storage protein[J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2004, 81(11):1005-1012.
- [32] Teuku T, Satosh W, Naoki Y, et al. Analysis of quantitative trait loci for protein and lipid contents in soybean seeds using recombinant inbred lines[J]. *Breeding Science*, 2003, 53(2):133-140.
- [33] 葛诚, 徐玲攻, 樊慧, 等. 快生型大豆根瘤菌的抗原分析[J]. *大豆科学*, 1984, 3(3):237-242. (Ge C, Xu L M, Fan H. Analysis of antigens for fast growing *R. japonicum* [J]. *Soybean Science*, 1994, 13(4):331-335.)
- [34] 葛诚, 李俊, 樊慧等. 大豆三类共生体的生态学研究[J]. *大豆科学*, 1994, 13(4):331-335. (Ge C, Li J, Fan H. Studies on ecology of the three groups of soybean rhizobia [J]. *Soybean Science*, 1994, 13(4):331-335.)
- [35] 樊慧, 徐玲攻, 葛诚等. 大豆根瘤菌优良菌株与春大豆品种的亲合性研究[J]. *大豆科学*, 1992, 11(2):139-145. (Ge C, Xu L M, Fan H. Studies on compatibility between superior indigenous soybean Rhizobial strains and soybean cultivars [J]. *Soybean Science*, 1992, 11(2):139-145.)

(上接第 599 页)

- [13] Mansur L M, Lark K G, Kross H, et al. Interval mapping of quantitative trait loci for reproductive morphological and seed traits of soybean (*Glycine max* L. Mer.) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1993b, 86:907-913.
- [14] Lark M L. Interactions between quantitative trait loci in soybean in which trait variation at one locus is conditional upon a specific allele at another [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1995, 92:4656-4660.
- [15] Lee S H, Bailey M A, Mian M A R. Molecular markers associated with soybean plant height lodging and maturity across locations [J]. *Crop Science*, 1996, 36(3):728-735.
- [16] Lee S H, Bailey M A, Mian M A R. Identification of quantitative trait loci for plant height, lodging and maturing in a soybean population segregation for growth habit [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, 92:516-523.
- [17] Mian M A R. QTLs conditional early growth in a soybean population segregation for growth habit [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 97(8):1210-1216.
- [18] Orf J H. Genetic of soybean agronomic traits; I. comparison of three related recombinant inbred populations [J]. *Crop Science*, 1999, 39(6):1642-1651.
- [19] Yuan J N. Quantitative trait loci in two soybean recombinant inbred line populations segregating for yield and disease resistance [J]. *Crop Science*, 2002, 42:271-277.
- [20] 魏燮中, 吴兆苏. 小麦植株高度的结构分析[J]. *南京农学院学报*, 1983, 1:14-21. (Wei X Z, Wu Z S. Architectural analysis of plant height of common wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 1983, 1:14-21.)
- [21] 刘兆晔, 于经川, 牟春生, 等. 小麦株高构成指数的研究[J]. *莱阳农学院学报*, 2000, 17(2):120-123. (Liu Z Y, Yu J C, Mu C S, et al. A study on the plant height component indexes of wheat [J]. *Journal of Laiyang Agricultural College*, 2000, 17(2):120-123.)