

植物 miRNA 的生物功能与研究方法

伊六喜, 苏少锋, 刘红葵, 斯钦巴特尔*

内蒙古农牧业科学院, 呼和浩特 010031

摘要: 植物 microRNA(miRNA)是近年来发现的一类在植物体内普遍存在的内源非编码小 RNA,与植物基因表达调控相关。本文综述了植物 miRNA 的特点、miRNA 与植物发育的关系及调控机制、植物 miRNA 研究方法等,对植物生长发育以及抗性的调控机制提供了研究方向,同时对于一些基因家族研究提供了理论基础。

关键词: microRNA;植物;基因调控

DOI:10.3969/j.issn.2095-2341.2013.03.03

Function and Research Methods of miRNA in Plants

YI Liu-xi, SU Shao-feng, LIU Hong-kui, SI Qin Ba-Teer*

Inner Mongolia Academy of Agriculture and Husbandry Sciences, Hohhot 010031, China

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) are a kind of endogenous small non-coding RNAs commonly found in plants in recent years, and are involved in gene expression in plants. This paper reviews the characteristics of the plant miRNA, the relationship between miRNA and plant development, as well as regulatory mechanism, and research methods in plants, so as to make a direction to do research on regulatory mechanism of plant growth and development as well as plant resistance, at the same time to provide a theoretical basis for some gene family research.

Key words: microRNA;plant;gene regulation

长期以来,多数研究者认为除了成熟 snRNA、tRNA 和 rRNA 外,大部分 RNA 仅仅在 DNA 和蛋白质之间起桥梁作用,但随后发现 RNA 也可能参与真核细胞中基因表达的调控^[1]。1993 年, Lee 等^[2]和 Wightman 等^[3]分别在研究线虫胚胎发育时发现了 19 ~ 25 个核苷酸组成的非编码单链小 RNA,从而打开了研究 miRNA 的序幕。紧接着在线虫中又发现了具有类似结构的 miRNA。miRNA 通过碱基互补配对原则结合于靶基因 mRNA 的侧翼区域或编码区域,从而调控植物的生理特征以及生物体对外界非生物或者生物胁迫因素的应答^[4,5]。近年来,植物 miRNA 的研究广泛而深入,对于揭示植物生长发育以及抗性调控机制等方面提供了新的研究方向,同时对于一些基因家族的研究提供了理论基础。

1 植物 miRNA 的特点

成熟的 miRNA 通常为 21 个核苷酸,不编码蛋白质,没有开放阅读框,为单链颈环结构 RNA 形式,与其他短链或降解的功能性 RNA 具有明显不同。miRNA 来源于任意发夹结构的端臂,大多数 miRNA 起源于 5'臂,与 5'臂动力学不稳定性有关。Allen 等^[6]把植物 miRNA 分为保守和非保守两种模型,保守 miRNA 在植物分化为不同类群之前就已进化完成,而非保守 miRNA 则是在现有植物种群都出现后才开始进化。对比不同物种的 miRNA 发现,miRNA 基因簇涉及序列的保守性及基因排列的共线性等问题。编码基因与 miRNA 通常会簇集在一起,两个或多个基因由一个前体

收稿日期:2013-01-21; 接受日期:2013-04-10

基金项目:国家自然科学基金项目(31060197)资助。

作者简介:伊六喜,硕士,主要从事植物分子生物学研究。E-mail:yiliuxivip@163.com。* 通讯作者:斯钦巴特尔,研究员,博士,主要从事植物分子生物学研究。E-mail:nmgbaater@163.com

miRNA 加工而来,成簇排列的基因会产生协同作用并显现出数量优势的表达。植物 miRNA 的功能主要为在转录后水平调控基因表达。

2 miRNA 与植物发育与调控

剪切降解和翻译抑制是 miRNA 的两种作用机制。miRNA 的作用受序列配对原则的影响,通过靶 mRNA 与 miRNA 的互补程度来控制切割降解或翻译抑制。在植物和动物发育过程中,miRNA 与靶 mRNA 结合的程度和部位以及作用方式都有所不同^[7]。在物种体中,多数 miRNA 以不完全互补方式结合于靶 mRNA 的 3'端非翻译区,从而阻碍其 mRNA 的翻译,但不影响 mRNA 的稳定性^[8,9]。

植物 miRNA 功能与多种蛋白质、泛素连接酶、F-box 因子类基因的转录产物密切相关,多属于参与植物根、叶、茎、花发育调控的转录因子家族。通过 mRNA 编码区的碱基配对原则在 miRNA 固定碱基位进行切割并降解靶 mRNA。在拟南芥中发现的 miR160 作用于靶基因 ARF10 和 ARF16 因子从而抑制植物的向性生长^[10,11]。近几年,植物 miRNA 在重要农作物中有广泛的研究,如玉米 GL15 mRNA 受到 miR172 的负调控,与玉米叶和茎的发育相关^[12]。

2.1 miRNA 参与植物生殖器官发育

在植物个体发育中,花的分化标志着植物从营养生长转入了生殖生长。植物从发芽出苗开始,经过根、茎、叶等的营养生长,才开始形成花芽,随后经过开花、传粉、受精,最终结出果实。花、果实和种子是植物的生殖器官,它们的形成和生长过程受 miRNA 的调控和控制,植物 miRNA 调控花的形态和开花时间。研究发现,miR159 负调控植物 MYB 家族的 MYB33 和 MYB65 的表达,参与花粉囊的形态构成^[13,14]。Schmid 等^[15]发现 miR172 能够促进拟南芥的提前开花,miR172 通过 AP2 基因调控开花时间,miR172 介导 AP2 基因表达下调,促进开花,证明了植物生殖器官生长过程中对开花时间起到重要作用。Yu 等^[16]研究 SPL 基因家族时发现,拟南芥中 miRNA156 可以靶向 SPL15、SPL13、SPL11、SPL10、SPL9、SPL6、SPL5、SPL3 和 SPL2 等十个转录因子,通过这些转录因子对植物生长发育的影响来调控营养生长及

生殖器官发育。之后进一步研究发现,植物胚的发育过程中,胚的过早或延迟成熟与 SPL11 和 SPL10 被 miRNA156 的抑制密切相关,表明植物胚形态建成受 miRNA 的调控。

2.2 miRNA 参与植物激素信号传导

植物激素的研究始于 20 世纪 30 年代的生长素研究,50 年代又发现了赤霉素和细胞分裂素,60 年代起脱落酸和乙烯又被列入植物激素的名单中。目前大家公认的植物激素即生长素类、赤霉素类、细胞分裂素类、乙烯和脱落酸五类。植物激素也与 miRNA 的调控相关。miR159 受赤霉素的调节,cGMP 在植物细胞内起着第二信使的作用^[17]。用赤霉素处理糊粉层细胞约 1 h 后,cGMP 水平骤然升高,因此认为靶基因 GAMYB 受 miR159 的作用;同时脱落酸诱导表达也与 miR159 有关,Reyes 等^[18]发现,用脱落酸处理拟南芥种子萌发时,MYB33 和 MYB101 两个转录因子受到 miR159 的靶向。目前,细胞分裂素和乙烯与 miRNA 之间研究报道较少,Liu 等^[19]研究拟南芥突变体时发现,miR172、miR319、miR159 和 miR394 的表达受细胞分裂素和乙烯调节,但作用机制以及信号传导途径仍不明确。

2.3 miRNA 参与植物叶片与茎的发育

植物体是由细胞组成的,而植物的生长实际上就是细胞数目的增多和体积的增大,因此,植物生长是一个体积或重量的不可逆的增加过程。植物生长的性质和动物的有本质上的区别。植物茎和叶的维管形成层的生长通过 miR165 引起 PHAVOLUTA 转录因子的调控。在 *phv* 突变体烟草的研究中证实,miR165 的功能抑制后,叶和茎维管系统生长发生异常^[20,21]。以玉米为材料研究 *GLOSSY15* 基因时观察到了该基因具有幼年期叶片增多并延缓生殖发育的异常功能,进一步研究发现这是由 miR172 的负调控所引起的^[12]。近几年已发现多种 miRNA 与植物体生长发育有关,如 miR319、miR156、miR164 和 miR160 等^[22]。

2.4 miRNA 对植物气孔的调控

气孔是高等植物与外界环境交换空气、能量以及营养素的生理通道。气孔是运动的。一般来说,气孔在白天开发,晚上关闭。近几年发现气孔的运动与 miRNA 有关。气孔保卫细胞中存在多种间接或直接 miRNA 的调控作用。Liu 等^[23]发

现 miR159 参与脱落酸的合成,从而调控气孔的关闭。Liu 等^[24]通过 Northern 杂交发现,miRNA396 在拟南芥叶子中显著表达,并且叶子中的保卫细胞数目减少导致气孔密度降低。

2.5 miRNA 对植物抗性的调控

植物体是一个开放体系,生存于自然环境。自然环境不是恒定不变的,不同地区水热条件相差悬殊,即使同一地区,一年四季也有冷热旱涝之分。对植物产生伤害的环境称为逆境。逆境因素包括生物因素和非生物因素,生物因素有病害、虫害和杂草;非生物因素包括寒冷、高温、干旱和盐渍等。植物对不良环境的适应性和抵抗力,称为植物的抗性。近几年研究表明,miRNA 对植物的抗性起重要作用^[25~28]。Sunkar 等^[29]采用逆境条件下的植物幼苗进行构建 miRNA 文库,发现 miR393、miR397 和 miR398 在低温胁迫下表达,同时 miR397 和 miR398 高盐环境中也同样观察了表达;miR168、miR528 和 miR167 在干旱胁迫后表达;miR778、miR827、miR399、miR395、miR408 和 miR857 在养分胁迫下表达。植物在不同胁迫环境中相应的诱导或抑制 miRNA,有时不同逆境环境中参与同一个 miRNA。目前,植物抗性与更多 miRNA 相应的相关机制尚不明确^[30~33]。

3 植物 miRNA 研究方法

3.1 植物 miRNA 的获得

miRNA 的获得可通过筛选、克隆、生物信息学预测和测序四种途径。

3.1.1 突变体的筛选 通过突变体筛选可以获得所需要的 miRNA,但产率低,难度大。到目前为止,仅在拟南芥上通过该方法获得了 miR164^[34]。

3.1.2 miRNA 的克隆 直接克隆法广泛应用于 miRNA 的发现和鉴定中。其优点是能比较有效且可持续地获得 miRNA。在植物中获得 miRNA 最早就采用克隆法,已在 15 个 miRNA 家族得到了 19 个 miRNA 成员。在研究中,实验人员根据 miRNA 前体序列的相关特征,自全基因组中直接克隆得到 miRNA,并获得了一系列通过特定诱导表达的 miRNA^[35]。

3.1.3 生物信息学预测 通过生物信息学方法能够对动植物体中的全基因组中进行相关的

miRNA 的预测以便获得最多 miRNA 信息。根据动植物 miRNA 的序列特征已开发出的相应的预测程序,在相关领域得到广泛应用^[36]。

3.1.4 高通量测序 近年来,植物 miRNA 的鉴定与定量分析开始应用 454、MPSS 和 Solexa 等高通量测序技术,高通量测序方法比传统测序方法具有操作简单、费用低廉、技术灵活、灵敏度高的优势。Solexa 测序技术可能成为植物 miRNA 在不同情况下表达研究的重要手段,因为 Solexa 测序能够精确地给出各个 miRNA 的表达量、植物 miRNA 的大小以及分布情况等信息。此外 Solexa 可以在一次试验中读取 40 万~400 万条序列,涵盖植物单个细胞所有的 miRNA^[37]。因此通过高通量的测序,理论上可以鉴定植物全基因组水平的 miRNA 图谱,应进一步发掘。

3.2 植物 miRNA 的生物学验证

目标物种中 miRNA 的生物学验证方法有 Northern 杂交、实时定量 PCR 和 miRNA 抑制剂等三种。

Northern 杂交法广泛应用于不同功能的 miRNA 的生物学验证。其优点是实验成本和技术难度较低,且能反映 miRNA 分子的各项参数。缺点是灵敏度较低。为了提高 miRNA 的 Northern 杂交的灵敏度,许多研究者通过采用不同的探针,例如采用锚定核苷酸(locked nucleotide acid, LNA)修饰的寡核苷酸标记探针和 LNA 探针或者改变 RNA 固定方法,极大地提高了 miRNA 检测效率^[38]。

实时定量 PCR(real-time PCR)的优点是灵敏度高,用极少量的 RNA 即可获得精确结果。缺点是需要设计特异性引物及探针,且实验结果受反应体系、操作流程及实验环境影响较大^[39]。根据引物的不同,实时定量 PCR 法还可进一步分为特异茎环反转录引物(stem-loop RT primer)法、引物延伸法和 Poly A 加尾法^[40]。

miRNA 抑制剂是一种经过一定化学修饰的,并与目标 miRNA 序列特异性互补的反义寡核苷酸(ASO)序列。通过转染进入真核细胞后,抑制剂可与目标 miRNA 分子快速稳定地互补结合,从而阻止 miRNA 与靶基因结合来抑制 miRNA 功能^[41]。

3.3 植物 miRNA 靶基因验证

目前靶基因验证主要有 5'-RACE、抗 miRNA

表达、农杆菌介导法等三种方法。植物中最广泛应用的是农杆菌介导法,此方法不需要昂贵的实验成本以及先进的实验仪器,直接注射在植物叶片或花蕾即可。根据 miRNA 序列设计引物,同时 PCR 克隆构建表达载体并直接跟目标基因结合,两种 miRNA 将同时表达,缺点是效率较低,耗时间交长。5'-RACE 方法可以验证靶基因的剪切作用,并且在精确的碱基位点发生剪切作用。抗 miRNA 的表达方法不改变蛋白质序列即不发生碱基突变,可以有效验证目标 miRNA 与靶基因相互作用^[42]。

4 展望

第一次发现小 RNA 分子机理开始到现在历经了将近半个世纪的研究,miRNA 途径已经在各个领域被很多研究者所关注,是真核生物调控基因表达的重要手段,成为了当今生物学研究的一个热点领域,荣登 2002 年十大科学发现之首,它的后续相关研究也占据了 2003 年、2006 年十大科学发现之一。一方面,miRNA 的研究为植物生长发育现象提供了新的研究和方向;另一方面在深入研究不同物种对象时,会发现更多的新 miRNAs,尤其是来自地方性特色动植物的那些 miRNAs。目前 miRNA 的鉴定和靶基因的预测仍在进行,miRNA 是调控发育机制的第一步。为进一步研究 miRNA 的功能,并将其应用于各领域的基因表达研究中,还需要进一步解析它在生物体中的生物学功能。

参 考 文 献

- [1] Chiang H R, Schoenfeld L W, Ruby J G, *et al.*. Mammalian microRNAs experimental evaluation of novel and previously annotated genes[J]. *Genes. Dev.*, 2010, 24: 992–1009.
- [2] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* [J]. *Cell*, 1993, 75 (5): 843–854.
- [3] Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediate temporal pattern formation in *C. elegans*[J]. *Cell*, 1993, 75(5): 855–862.
- [4] Kantar M, Unver T, Budak H, *et al.*. Regulation of barley miRNAs upon dehydration stress correlated with target gene expression[J]. *Funct. Integr. Genomics*, 2010, 10 (4): 493–507.
- [5] Li A L, Mao L. Evolution of plant microRNA gene families [J]. *Cell Research*, 2006, 17(3): 212–218.
- [6] Allen E, Xie Z, Gustafson A M, *et al.*. Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Nat. Genet.*, 2010, 36 (12): 1282–1290.
- [7] Khraiwesh B, Ossowski S, Weigel D, *et al.*. Specific gene silencing by artificial microRNAs in *Physcomitrella patens*: an alternative to target gene knockouts[J]. *Plant Physiol.*, 2008, 148 (2): 684–693.
- [8] 杨曦,何玉科. 植物 microRNA 的生物合成和调控功能[J]. *生命科学*, 2010, 22(7): 689–696.
- [9] 郭韬,李广林,魏强,等. 植物 MicroRNA 功能的研究进展[J]. *西北植物学报*, 2011, 11: 2347–2354.
- [10] Chen X. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* flower development [J]. *Science*, 2004, 303(5666): 2022–2025.
- [11] Guo H S, Xie Q, Fei J F, *et al.*. MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for *Arabidopsis* lateral root development[J]. *Plant Cell*, 2005, 17(5): 76–86.
- [12] Lauter N, Kampani A, Calson S, *et al.*. *microRNA172* down regulates *glossy15* to promote vegetative phase change in maize [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, 102(26): 9412–9417.
- [13] Millar A A, Gubler F. The *Arabidopsis* *GAMYB-like* genes, *MYB33* and *MYB65*, are microRNA-regulated genes that redundantly facilitate anther development [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(3): 705–721.
- [14] Wu G, Park M Y, Conway S R, *et al.*. The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*[J]. *Cell*, 2009, 138(4): 750–759.
- [15] Schmid M, Uhlenhaut N H, Godard F, *et al.*. Dissection of floral induction pathways using global expression analysis[J]. *Development*, 2003, 130: 6001–6012.
- [16] Yu N, Cai W J, Wang S, *et al.*. Temporal control of trichome distribution by microRNA156-targeted *SPL* genes in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Cell*, 2010, 22 (7): 2322–2335.
- [17] Allen R S, Li J Y, Stahle M L, *et al.*. Genetic analysis reveals functional redundancy and the major target genes of the *Arabidopsis* miR159 family[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, 104 (41): 16371–16376.
- [18] Reyes J L, Chua N H. ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during *Arabidopsis* seed germination[J]. *Plant J.*, 2007, 49(4): 592–606.
- [19] Liu Q, Zhang Y C, Wang C Y, *et al.*. Expression analysis of phyto-hormone regulated microRNAs in rice, implying their regulation roles in plant hormone signaling[J]. *FEBS Lett.*, 2009, 583(4): 723–728.
- [20] Carlsbecker A, Lee J Y, Roberts C J, *et al.*. Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate [J]. *Nature*, 2010, 465(7296): 316–321.
- [21] Tang G L. Plant microRNAs: an insight into their gene structures and evolution[J]. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 2010, 21(8): 782–789.

- [22] Chen X M. MicroRNA biogenesis and function in plants [J]. FEBS Lett., 2005, 579(26): 5923–5931.
- [23] Liu H H, Tian X, Li Y J, *et al.*. Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana* [J]. RNA, 2008, 14(5): 836–843.
- [24] Liu D, Song Y, Chen Z, *et al.*. Ectopic expression of miR396 suppresses GRF target gene expression and alters leaf growth in *Arabidopsis* [J]. Physiol. Plant., 2009, 136(2): 223–236.
- [25] Jian X Y, Zhang L, Li G L, *et al.*. Identification of novel stress-regulated microRNAs from *Oryza sativa* L [J]. Genomics, 2010, 95(1): 47–55.
- [26] Zhao B T, Liang R Q, Ge L F, *et al.*. Identification of drought-induced microRNAs in rice [J]. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2007, 354(2): 585–590.
- [27] Fujii H, Chiou T J, Lin S I, *et al.*. A miRNA involved in phosphate-starvation response in *Arabidopsis* [J]. Curr. Biol., 2005, 15(22): 2038–2043.
- [28] Zhang Z X, Wei L Y, Zou X L, *et al.*. Submergence-responsive microRNAs are potentially involved in the regulation of morphological and metabolic adaptations in maize root cells [J]. Ann. Bot., 2008, 102(4): 509–519.
- [29] Sunkar R, Zhu J K. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2004, 16(8): 2001–2019.
- [30] Jagadeeswaran G, Saini A, Sunkar R. Biotic and abiotic stress down-regulate miR398 expression in *Arabidopsis* [J]. Planta, 2009, 229(4): 1009–1014.
- [31] Wei L Y, Zhang D F, Xiang F, *et al.*. Differentially expressed miRNAs potentially involved in the regulation of defense mechanism to drought stress in maize seedlings [J]. Int. J. Plant Sci., 2009, 170(8): 979–989.
- [32] Pant B D, Buhtz A, Kehr J, *et al.*. MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis [J]. Plant J., 2008, 53(5): 731–738.
- [33] Chiou T J, Aung K, Lin S I, *et al.*. Regulation of phosphate homeostasis by microRNA in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2006, 18(2): 412–421.
- [34] Baker C C, Sieber P, Wellmer F, *et al.*. The early extra petals1 mutant uncovers a role for microRNA miR164c in regulating petal number in *Arabidopsis* [J]. Curr. Biol., 2005, 15(4): 303–315.
- [35] Llave C, Kasschau K D, Rector M A, *et al.*. Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants [J]. Plant Cell, 2002, 14(7): 1605–1619.
- [36] Xie F L, Huang S Q, Gou K, *et al.*. Computational identification of novel mi-croRNAs and targets in *Brassica napus* [J]. FEBS Lett., 2007, 581(7): 1464–1474.
- [37] 康巧林. 高通量测序技术在植物 MicroRNA 研究中的应用 [J]. 广东农业科学, 2012, 39(5): 114–117.
- [38] Völöcz A, Hornyik C, Varga N, *et al.*. Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligo-nucleotide probes [J]. Nucleic Acids Res., 2004, 32(22): e175.
- [39] Schmittgen T D, Lee E J, Jiang J M, *et al.*. Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA [J]. Methods, 2008, 44(1): 31–38.
- [40] Chen C, Ridzon D A, Broomer A J, *et al.*. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR [J]. Nucleic Acids Res., 2005, 33(20): e179.
- [41] Hutvagner G, Simard M J, Mello C C, *et al.*. Sequence-specific inhibition of small RNA function [J]. PLoS Biol., 2004, 2(4): 465–475.
- [42] Llave C, Xie Z, Kasschau K D, *et al.*. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA [J]. Science, 2002, 297(5589): 2053–2056.