



玉米AGO基因的克隆与表达分析

许 鑫¹,李丹丹²,李双江¹,阚云超²,李春奇^{1*}

(1 河南农业大学 生命科学学院, 郑州 450002; 2 南阳师范学院 河南省伏牛山昆虫生物学重点实验室, 河南南阳 473061)

摘要:以玉米自交系‘昌7-2’三叶期前后2个时间点(种子萌发后5 d和8 d)幼苗不同组织部位的总RNA为研究对象,采用实时荧光定量PCR技术,对玉米中6个Argonaute(AGO)蛋白家族基因(AGO1、AGO2、AGO4、AGO5、AGO7和AGO10)在幼苗不同发育时期及不同组织部位的表达谱进行了研究。结果表明:(1)AGO1、AGO2、AGO4和AGO7在种子萌发后5 d和8 d幼苗不同组织中均有表达,种子萌发后5 d幼苗中的平均表达量均高于萌发8 d的幼苗,且在地面上部分新生组织或细胞分裂比较旺盛的组织中表达较多,表明AGO1、AGO2、AGO4和AGO7可能在玉米幼苗发育早期的分生组织分裂生长中发挥调控作用。(2)AGO5和AGO10只在叶片和茎尖中表达,其他组织中不表达;其中AGO5主要集中在新生叶和种子萌发后8 d的茎尖中,AGO10在玉米叶发育过程中可能存在迁移的现象。

关键词:玉米;幼苗;AGO基因;表达谱

中图分类号:Q789 **文献标志码:**A

Clone and Expression Analysis of AGO Genes from *Zea mays* L.

XU Xin¹, LI Dandan², LI Shuangjiang¹, KAN Yunchao², LI Chunqi^{1*}

(1 College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2 Henan Provincial Key Laboratory of Funiu Mountain Insect Biology, Nanyang Normal University, Nanyang, Henan 473061, China)

Abstract: The expression profiles of 6 AGO genes(AGO1,AGO2,AGO4,AGO5,AGO7 and AGO10)in different tissues and developmental stages of maize seedling(*Zea mays* L. inbred line, ‘Chang 7-2’) were analyzed by the method of real-time quantitative PCR. Results showed that:(1)AGO1,AGO2,AGO4 and AGO7 were accumulated more in the seedlings at the 5th day after maize seed germination than that at the 8th day, exhibiting more expression in dividing cells and newborn tissues, which indicated that AGO1,AGO2,AGO4 and AGO7 might play roles in meristem of maize seedling at the early stage after germination. (2)AGO5 and AGO10 were only expressed in leaves and shoot tips,AGO5 mainly expressed in the newborn leaves and shoot tip at the 8th day after germination, while AGO10 showed migration in leaves during development.

Key words: *Zea mays* L. ; seedling; AGO gene; expression

RNA诱导的沉默复合体(RISC)是miRNA发挥作用时的主要成分,RISC是一种包含Argonaute(AGO)蛋白的核糖核蛋白复合物,其核心成分是AGO家族蛋白^[1-2],AGO蛋白能结合miRNA或siRNA,在miRNA或siRNA的介导下识别靶基因并剪切靶基因或造成靶基因翻译抑制^[3]。在动物中,AGO蛋白和小RNA复合体与目标RNA相互

作用通常导致转录后基因沉默,造成靶基因的不稳定或翻译抑制^[4];在植物中,AGO蛋白和小RNA复合体参与维持基因组的稳定、调控组织发育、对逆境的适应性应答以及对入侵核酸(转基因和植物病毒)的免疫^[5]。近年来,由于AGO蛋白在基因转录后调控过程中的特殊作用,对其结构、功能以及作用机制的研究日益成为焦点。在果蝇,拟南芥、水稻、

收稿日期:2013-12-07;修改稿收到日期:2014-02-26

基金项目:河南省科技厅农业重点攻关项目(112102110158)

作者简介:许 鑫(1988—),女,在读硕士研究生,主要从事植物分子生物学研究。E-mail:jzbetty@163.com

*通信作者:李春奇,博士,教授,主要从事植物解剖研究。E-mail:licq66@126.com

玉米中对 AGO 蛋白都有研究,在拟南芥和水稻中分别发现了 10 个和 19 个 AGO 蛋白^[6-10]。AGO1 与 miRNA 沉默通路相关^[7-8],AGO4 与内源的 siRNAs 结合导致基因沉默^[9-10],AGO7 主要是维持分生组织和植物从幼嫩到成熟生长阶段的过渡^[11]。

玉米是世界主要的粮食作物,也是重要的饲料作物。目前在玉米中发现了 321 条成熟的 miRNA 序列,它们参与到玉米的生长发育和逆境胁迫过程中^[12-18]。对 miRNA 功能的解析离不开对 AGO 基因功能的研究,Qian 等通过预测的方法已经在玉米 B73 中鉴定出 7 个 AGO 家族 18 个基因,但对其在玉米发育过程中详细的时空表达谱及功能未进行深入研究^[19]。拟南芥中发现,部分 AGO 基因在分生组织和植物从幼嫩到成熟生长阶段的过渡中发挥重要作用^[11,20],而三叶期是玉米从幼嫩到成熟生长过渡的一个重要时期,选取河南省普遍种植的玉米自交系‘昌 7-2’为研究对象,对 AGO 家族 6 个主要基因在三叶期前后(种子萌发后 5 和 8 d)幼苗不同发育阶段及不同组织部位的表达谱进行研究,为探索 AGO 基因协助 miRNA 参与玉米发育的调控机制奠定基础,也为从非编码 RNA 作用机制角度进行玉米自交系‘昌 7-2’的转基因改良提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

以河南农业大学农学院提供的玉米自交系‘昌 7-2’为材料,种子用质量浓度为 1 g/L 的 $HgCl_2$ 消毒 10 min,蒸馏水冲洗干净,28 °C 暗处浸种 24 h,暗处催芽 48 h,移至 1 × Hoagland 营养液中培养(温度 28 °C,湿度 70%,光照/黑暗时间为 14 h/10 h),分别取种子萌发后 5 d 和 8 d 的整株幼苗及不同天数的根、茎尖(茎尖生长点上下约 2 mm 的组织)、胚芽鞘、第一叶、第二叶、第三叶和第四叶(按出现顺序命名,种子萌发后最早出现的叶片为第一叶,以此类推),置液氮中研磨,TRIzol 法提取总 RNA。

1.2 方法

1.2.1 AGO 基因的克隆与测序 取玉米幼苗总 RNA 2 μ g,使用反转录试剂盒(Promega)进行 cDNA 的合成。利用表 1 所列引物及高保真酶扩增 6 个 AGO 基因。PCR 产物采用 DNA 凝胶回收试剂盒(Axygen)回收,将回收的目的片段连接 PMD-19 T easy 载体(Takara),转化大肠杆菌,挑取阳性克隆,送北京奥科鼎盛生物技术有限公司进行测序。测序结果用 DNAMAN 进行序列比对。

表 1 实时荧光定量 PCR 所用引物

Table 1 Primer sets for real-time PCR

名称 Name	序列(5'→3') Sequence(5'→3')
AGO1-F	ATGGTGAGGAAGAAAAGGACT
AGO1-R	TGGTATCCACCATGTCCCTG
AGO2-F	CGGGATCCATGGAGTACGAGCGCGGTGG
AGO2-R	GCTCGAGTTACTCCTGTCCATTGGCGCAA
AGO4-F	CGGGATCCATGGGCTCTCATGATGGCGA
AGO4-R	GCTCGAGTTAGCTCCATTGGCAGCAGTCT
AGO5-F	CGGGATCCATGCAAAATAATGGGAGACC
AGO5-R	GCTCGAGTTAGCCACCAACCTAACATTAA
AGO7-F	GGGATCCATGGAGTACGAGCGCGGGGA
AGO7-R	GCTCGAGTTATTCCCTGACCATGGGCGCAG
AGO10-F	GGGATCCATGTATGGTTTACCATTC
AGO10-R	GCTCGAGTTAATACTCAACCAAGGTGCAG
actin-F	GATGATGCGCCAAGAGCTG
actin-R	GCCTCATCACCTACGTAGGCAT

1.2.2 实时荧光定量 PCR 取玉米不同时期不同组织部位的总 RNA 2 μ g,使用反转录试剂盒(Promega)进行 cDNA 的合成。采用 FastStart Universal SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒(Roche)进行 Real-time PCR。PCR 反应条件为:95 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,40 个循环。PCR 引物如表 1 所示,actin 为内参基因,灭菌双蒸水模板为阴性对照。PCR 结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量高低[Ct 为循环阈值,表示每一个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数, ΔCt =目的基因的平均 Ct 值—内参基因的平均 Ct 值, $\Delta\Delta Ct=\Delta Ct_{(样本1)}-\Delta Ct_{(样本2)}$]。

2 结果与分析

利用玉米 B73 基因组数据库中得到的 7 个 AGO 基因序列设计引物,通过高保真酶在玉米自交系‘昌 7-2’中扩增相应的 AGO 基因,得到 AGO1、AGO2、AGO4、AGO5、AGO7 和 AGO10 均有单一的扩增产物,且无引物二聚体污染(图 1)。通过测序鉴定发现,‘昌 7-2’中扩增到的 AGO4 基因片段与 B73 中对应的基因序列完全相同,AGO1、AGO2 与 B73 仅差别 1 个碱基,AGO5 与 B73 差别 2 个碱基,AGO7 和 AGO10 分别与 B73 有 7 个和 15 个碱基的差别,序列一致性为 98% 和 89%(图 2),表明在‘昌 7-2’中扩增的为真实的 AGO 家族基因。

为了获得 AGO 基因在玉米幼苗中的时空表达谱,选取玉米种子萌发后 5 d 和 8 d 不同组织部位的 RNA 为研究对象,采用实时荧光定量 PCR 的方法

检测不同 AGO 基因的表达水平。由图 3 可知, AGO1、AGO2、AGO4 和 AGO7 在种子萌发后 5 d 和 8 d 幼苗不同组织中均有表达, 但 AGO5 和 AGO10 只在叶片和茎尖中表达, 其他组织中不表达, 表明不同的 AGO 基因在玉米幼苗中可能具有不同的功能。

由图3,A结果可得,AGO1在玉米叶片中表达量最高,在茎尖、胚芽鞘中次之,在根中表达量最低。AGO1在种子萌发后5d幼苗中的总体表达量明显高于8d的幼苗,表明在玉米幼苗发育早期对AGO1的需求量较高。比较不同叶片中AGO1的表达量可得,AGO1在新生叶片中表达量明显高于老叶片,这也表明AGO1在细胞分裂生长比较旺盛的

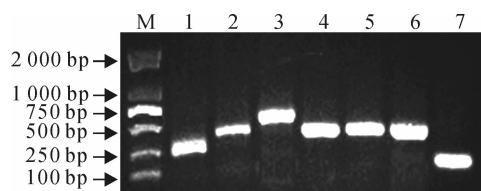


图 1 6 个 AGO 基因 RT-PCR 扩增结果
M, DL2000; 1~7 分别为 AGO1、AGO2、AGO4、
AGO5、AGO7、AGO10 和 *actin*

Fig. 1 RT-PCR results of amplification of six AGO genes. M. DL2000; 1~7 represented the amplification results of *AGO1*, *AGO2*, *AGO4*, *AGO5*, *AGO7*, *AGO10*, and *actin*.

组织中表达较多。比较胚芽鞘中 AGO1 的表达量可得,AGO1 在种子萌发后 5 d 的表达量是 8 d 表达量的 15 倍。种子萌发早期,胚芽鞘作为幼苗的保护组织存在一定的细胞分裂和生长,到种子萌发后 8 d 幼苗进入快速生长阶段,主要依靠根吸收营养,原始种子的组成部分逐渐衰老死亡,胚芽鞘作为种子最外层的保护组织,也逐渐衰亡,AGO1 在此组织中表达量急剧下降,也从侧面表明在玉米地上部分新生组织(或分裂较旺盛的组织)中对 AGO1 的需求量较大。

AGO2 在玉米叶中表达量较高, 在茎尖中次之, 在胚芽鞘、根中表达量最低。AGO2 在种子萌发后 5 d 幼苗中的总体表达量高于 8 d, 在新生叶片中表达量高于老叶片(图 3, B), 这也表明 AGO2 在细胞分裂生长比较旺盛的组织中表达较多。不同于 AGO1, AGO2 在根和茎尖中从种子萌发后 5 d 到 8 d 都有一个小幅上升的趋势, 表明在玉米幼苗生长过程中, 根和茎尖中 AGO2 的需求量有上升的趋势。

AGO4 的表达趋势与 AGO1 和 AGO2 相似, 也是在玉米叶中表达量较高, 但在茎尖、胚芽鞘、根中表达量较低(图 3,C)。AGO4 在种子萌发后 5 d 幼苗中的总体表达量高于 8 d 的幼苗, 在新生叶片中表达量高于老叶片, 这也表明 AGO4 在细胞分裂生

		B	
B73	ATGTATGGTTCACCACTCACGCCATCCTCATCTTCCCTGCC	40	
Chang 7-2	ATGTATGGTTCACCACTCACGCCATCCTCATCTTCCCTGCC	40	
Consensus	atgtatggttcaccaattcagcatcctcatcttccctgcc		
B73	TTCAGGTTGGAAACCAAAAGGAAGGGAAACTATTCACCAT	80	
Chang 7-2	TTCAGGTTGGAAACCAAAAGGAAGGGAAACTATTCACCAT	80	
Consensus	ttcaggttggaaaccaaaagaaggaaactatcttccat		
B73	GGAGGGCTGCAAGATCTTGAGGCCAGAGATAACAGAAAG	120	
Chang 7-2	GGAGGGCTGCAAGATCTTGAGGCCAGAGATAACAGAAAG	120	
Consensus	ggaggcctgtcaagatcatggaaaggccagagatacacaag		
B73	AGGCTGAATGAAAAACAGATCACATCTTGCTAAAGGTTA	160	
Chang 7-2	AGGCTGAATGAAAAACAGATCACATCTTGCTAAAGGTTA	160	
Consensus	aggctgaatgaaaaacagatcacatcgctgtctaaaggta		
B73	CATGCCAAAGGCCATGAGAAACAGAGATGGATATTCTACA	200	
Chang 7-2	CATGCCAAAGGCCATGAGAAACAGAGATGGATATTCTACA	200	
Consensus	catgccaaggcctagagaacaagagatggatattctaca		
B73	GACAGTTCATAAATGATATGAGCAAGATCCATATGGG	240	
Chang 7-2	GACAGTTCATAAATGATATGAGCAAGATCCATATGGG	240	
Consensus	gacagttcataaaatgatatgagcaagatccatatgca		
B73	AAGGAATTGGGATCAACATIAGTGAGAAGGCTAACCTCTG	280	
Chang 7-2	AAGGAATTGGGATCAACATIAGTGAGAAGGCTAACCTCTG	280	
Consensus	aaggaaattgggatcaacattagtgagaaggtcaacctatg		
B73	TTGAAGCCCGAGTCCTTCCTCACCTTGGTTGAAGTAA	318	
Chang 7-2	TTGAAGCCCGAGTCCTTCCTCACCTTGGTTGAAGTAA	318	
Consensus	ttgaagcccgagtcccttcgtcaccttgggttgaagtat		

图 2 昌 7-2 和 B73 中 *AGO7*(A) 和 *AGO10*(B) 基因比对结果

Fig. 2 Alignment results of AGO7 (A) and AGO10 (B) between Chang 7-2 and B73

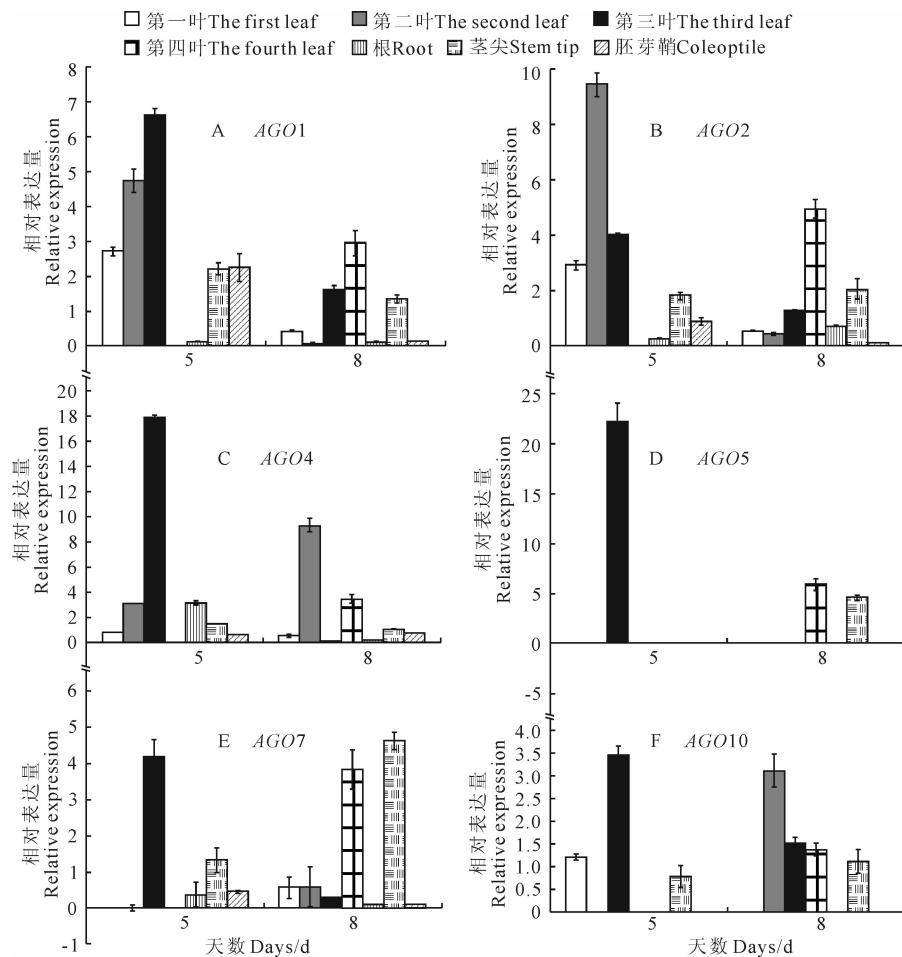


图 3 AGO 家族基因在玉米种子萌发后 5 d 和 8 d 不同组织中的相对表达量

Fig. 3 The relative expression of AGO family genes in different tissues at the 5th and 8th day after maize seed germination

长比较旺盛的组织中表达较多。

AGO7 的表达趋势与 AGO1、AGO2 和 AGO4 相似,也是在玉米叶中表达量较高,茎尖次之,胚芽鞘、根中表达量较低。AGO7 在种子萌发后 5 d 幼苗中的总体表达量稍高于 8 d 的幼苗,在新生叶片中表达量高于老叶片(图 3, E),这表明 AGO7 在细胞分裂生长比较旺盛的组织中表达较多。

AGO5 和 AGO10 的表达较其他 4 个基因有较大差别,AGO5 只在种子萌发后 5 d 的第三叶,种子萌发后 8 d 的第四叶和茎尖中表达,在其他组织中都不表达(图 3, D)。而 AGO10 只在叶片和茎尖中表达,在胚芽鞘和根中无表达。AGO10 在种子萌发后 5 d 幼苗中的总体表达量低于 8 d,在种子萌发后 5 d 幼苗的第一叶和第三叶中表达,在第二叶中不表达,但在种子萌发后 8 d 幼苗的第一叶中不表达,在第二叶、第三叶和第四叶中存在下降趋势(图 3, F),表明 AGO10 在玉米叶发育过程中可能存在迁移现象,但还需要更多的试验证据。

3 讨 论

RNA 诱导的沉默复合体 RISC 是 miRNA 行使功能的主要组分,其中 AGO 蛋白是其核心元件^[21]。AGO 家族蛋白首先在植物中发现,具有高度保守性。AGO 基因的功能在拟南芥中研究较多,但在玉米中相应的报道还很少^[6-10, 19-24]。本研究以河南省推广种植玉米自交系‘昌 7-2’为研究对象,首次系统探索了三叶期前后(种子萌发后 5 d 和 8 d)不同组织部位 AGO 基因的时空表达谱。结果显示 AGO1 在玉米地上部分新生组织或细胞分裂生长比较旺盛的组织中表达较多,表明玉米中的 AGO1 可能具有与拟南芥中 AGO1 相似的功能,都是存在于幼苗分裂组织中,对维持茎端细胞分化一致性起着决定性作用^[20, 24]。玉米 AGO5 与其他几个 AGO 基因在表达上存在着较大差异,主要集中在新生叶和种子萌发后 8 d 的茎尖中,从进化上来看,AGO5 本身处于单独的进化分支上^[19],可能发挥着与其他

AGO基因不同的功能。AGO7在种子萌发后5 d幼苗中的表达量明显高于8 d的幼苗,而且也是存在于细胞分裂较旺盛的组织中,表明玉米中AGO7可能和拟南芥中AGO7功能相似,也在维持植物从幼苗到成熟过渡生长阶段的分生组织分裂中发挥着作用^[24]。AGO10基因在植物多个发育阶段发挥着关键的作用,如维持茎尖分生组织干细胞的分裂能力及建立叶发育的极性等^[25],本研究中AGO10的表

达结果显示该基因在玉米叶发育过程中可能存在迁移的现象,表明AGO10可能与叶的极性发育相关,但具体机制还需进一步的研究。本结果将为定位AGO基因的具体作用部位及深入探索其参与玉米发育调控的作用机制奠定良好的基础,也为从非编码RNA作用机制角度入手对玉米进行转基因改良提供了理论依据。

参考文献:

- [1] HUTVAGNER G, SIMARD M J. Argonaute proteins: key players in RNA silencing[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008, **9**(1): 22–32.
- [2] HAMMOND S M, BERNSTEIN E, BEACH D, et al. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells[J]. *Nature*, 2000, **404**(6 775): 293–296.
- [3] MARTINEZ J, PATKANIOWSKA A, URLAUB H, et al. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi[J]. *Cell*, 2002, **110**(5): 563–574.
- [4] HUNTZINGER E, IZAURRALDE E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2011, **12**(2): 99–110.
- [5] LI CH(李超), DU ZH Y(杜志游), CHEN J SH(陈集双). Structural and functional elucidation of AGO proteins[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*(中国生物化学与分子生物学报), 2009, **25**(11): 969–976(in Chinese).
- [6] WU L, ZHANG Q, ZHOU H, et al. Rice microRNA effector complexes and targets[J]. *Plant Cell*, 2009, **21**(11): 3 421–3 435.
- [7] FAGARD M, BOUTET S, et al. AGO1, QDE-2 and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2000, **97**(21): 11 650–11 654.
- [8] VAUCHERET H, VAZQUEZ F, CRÉTÉ P, et al. The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development[J]. *Genes & Development*, 2004, **18**(10): 1 187–1 197.
- [9] ZILBERMAN D, CAO X, JACOBSEN S E. ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation[J]. *Science*, 2003, **299**(5 607): 716–719.
- [10] ZILBERMAN D, CAO X, JOHANSEN L K, et al. Role of *Arabidopsis* ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation triggered by inverted repeats[J]. *Current Biology*, 2004, **14**(13): 1 214–1 220.
- [11] HUNTER C, SUN H, POETHIG R S. The *Arabidopsis* heterochronic gene ZIPPY is an ARGONAUTE family member[J]. *Current Biology*, 2003, **13**(19): 1 734–1 739.
- [12] ZHANG B, PAN X, ANDERSON T A. Identification of 188 conserved maize microRNAs and their targets[J]. *FEBS Letters*, 2006, **580**(15): 3 753–3 762.
- [13] ZHANG L, CHIA J M, et al. A Genome-wide characterization of microRNA genes in maize[J]. *PLoS Genetics*, 2009, **5**(11): e1 000 716.
- [14] KANG M, ZHAO Q, ZHU D, et al. Characterization of microRNAs expression during maize seed development[J]. *BMC Genomics*, 2012, **13**: 360.
- [15] LIU P, YAN K, LEI Y X, et al. Transcript profiling of microRNAs during the early development of the maize brace root via Solexa sequencing[J]. *Genomics*, 2013, **101**(2): 149–156.
- [16] DING D, LI W, HAN M, et al. Identification and characterisation of maize microRNAs involved in developing ears[J]. *Plant Biology*, 2014, **16**(1): 9–15.
- [17] LI X M, SANG Y L, ZHAO X Y, et al. High-throughput sequencing of small RNAs from pollen and silk and characterization of miRNAs as candidate factors involved in pollen-silk interactions in maize[J]. *PLoS One*, 2013, **8**(8): e72 852.
- [18] GU Y, LIU Y, ZHANG J, et al. Identification and characterization of microRNAs in the developing maize endosperm[J]. *Genomics*, 2013, **102**(5–6): 472–478.
- [19] QIAN Y, CHENG Y, CHENG X, et al. Identification and characterization of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA polymerase gene families in maize[J]. *Plant Cell Reports*, 2011, **30**(7): 1 347–1 363.
- [20] LYNN K, FERNANDEZ A, AIDA M, et al. The PINHEAD/ZWILLE gene acts pleiotropically in *Arabidopsis* development and has overlapping functions with the ARGONAUTE1 gene[J]. *Development*, 1999, **126**(3): 469–481.
- [21] HANNON G J. RNA interference[J]. *Nature*, 2002, **418**(6 894): 244–251.
- [22] MOUSSIAN B, SCHOOF H, HAECKER A, et al. Role of the ZWILLE gene in the regulation of central shoot meristem cell fate during *Arabidopsis* embryogenesis[J]. *EMBO Journal*, 1998, **17**(6): 1 799–1 809.
- [23] QI Y, HE X, WANG X J, et al. Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation[J]. *Nature*, 2006, **443**(7 114): 1 008–1 012.
- [24] CARBONELL A, FAHLGREN N, GARCIA-RUIZ H, et al. Functional analysis of three *Arabidopsis* ARGONAUTES using slicer-defective mutants[J]. *Plant Cell*, 2012, **24**(9): 3 613–3 629.
- [25] LIU Q, YAO X, PI L, et al. The ARGONAUTE10 gene modulates shoot apical meristem maintenance and establishment of leaf polarity by repressing miR165/166 in *Arabidopsis*[J]. *Plant Journal*, 2009, **58**(1): 27–40.