

# 盐穗木 miR166a 前体和预测靶基因 *ATHB8-like* 的克隆及二者靶向关系的鉴定

张素伟, 易小娅, 曾幼玲\*

(新疆大学 生命科学与技术学院, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 乌鲁木齐 830046)

**摘要:**以盐生植物盐穗木为实验材料, 从前期构建的高盐胁迫下盐穗木根的小 RNA 文库中候选了差异表达的 miR166a, 利用生物信息学从盐穗木转录组数据中预测其靶基因; 采用 5' RLM-RACE 技术鉴定盐穗木 miR166a 对预测靶基因 *ATHB8-like* 的靶向性; 通过 PCR 和 RACE 技术克隆盐穗木 miR166a 前体和预测靶基因 *ATHB8-like* 全长基因序列, 并进行相应的生物信息学分析。结果显示: 盐穗木 miR166a 预测的靶基因为 *ATHB8-like*; 通过实验鉴定确实存在靶向切割, 具体的切割位点位于 miR166a 成熟体的 14~15 碱基之间; miR166a 成熟体序列在不同植物中高度保守; 克隆获得的盐穗木 miR166a 前体可折叠成完整的颈环结构, 符合 miRNA 的前体特征, 候选植物 miR166a 前体在进化上没有表现出保守性; 预测的靶基因 *ATHB8-like* cDNA 全长为 2 786 bp, 开放阅读框为 2 526 bp, 编码 841 个氨基酸, *ATHB8-like* 具有一个 HD-ZIP III 结构域, 在进化上具有保守性。该研究结果为进一步开展盐穗木 miR166a 和 *ATHB8-like* 的生物学功能奠定了基础。

**关键词:** 盐穗木; miR166a; *ATHB8-like*; 靶向关系; 克隆

**中图分类号:** Q785      **文献标志码:** A

## Clone and Correlation Identification of *Halostachys caspica* miR166a Precursor and Its Predicted Target *ATHB8-like*

ZHANG Suwei, YI Xiaoya, ZENG Youling\*

(Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

**Abstract:** In this study, miR166a with differential expression was candidated from the small RNA libraries of the halophyte *Halostachys caspica* roots established under high salinity (600 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl), some work was carried out as follows. miR166a-targeted gene was predicted from this species' transcriptome by bioinformatic analysis; the miR166a-targeting was identified with the technology of 5' RLM-RACE; miR166a precursor and full length of *ATHB8-like* were obtained by PCR and RACE methods and fully analyzed by bioinformatic softwares. The results showed that predicted target was *ATHB8-like*; 5' RLM-RACE validated the accurate cleavage site of the target by *H. caspica* miR166a between 14<sup>th</sup> to 15<sup>th</sup> base of its mature miRNA; *H. caspica* mature miR166a was highly conserved compared to different plant species; the miR166a precursor could be folded into complete hairpin structure and was met with various indexes of miRNA precursor and did not reflect the conservation in evolution by aligning with plant species available;

收稿日期: 2016-12-19; 修改稿收到日期: 2017-05-04

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2015211C274)

作者简介: 张素伟(1989-), 女, 硕士, 主要从事植物逆境生理和分子机制研究。E-mail: 690278053@qq.com

\* 通信作者: 曾幼玲, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事植物逆境生理和分子机制研究。E-mail: zeng\_ylxju@126.com

the full length cDNA of *ATHB8-like* is 2 786 bp that open reading frame is 2 526 bp with putative 841 amino acids containing a HD-ZIP III domain and *H. caspica* *ATHB8-like* was conserved compared to those *ATHB8* of different plants. This work will lay the foundation for further studying biological functions of *H. caspica* miR166a and its target.

**Key words:** *Halostachys caspica*; miR166a; *AHTB8-like*; correlation; clone

microRNA (miRNA) 是一类进化上高度保守的内源性非编码小 RNA, 长度约 21~24 nt, 为一类转录后调节因子, 通过序列互补与靶基因 mRNA 结合, 进行靶基因的降解或翻译抑制<sup>[1]</sup>。有功能的 miRNA 成熟体的产生需要经过多步加工。首先具有颈环结构的单链初级 miRNA (pri-miRNA) 在 DICER-like1 (DCL1) 的加工下形成 miRNA/miRNA\* 复合体, miRNA/miRNA\* 经转运蛋白运输到细胞质后与 RNA 诱导的沉默复合体 (RISC) 中的 AGO 蛋白结合, miRNA 与 AGO 蛋白结合后识别靶基因的互补区域进而负调节靶 mRNA 的表达<sup>[2]</sup>。目前验证 miRNA 切割或抑制靶基因的方法主要包括 5' RLM-RACE, 降解组测序, 烟草瞬时表达实验, qRT-PCR 以及 miRNA-AGO-mRNA 复合体, 其中 5' RLM-RACE 是在被 miRNA 特异切割后的靶基因上加上一个接头, 随后使用接头引物和基因特异性引物进行反转录获得加接头的 cDNA, 之后通过巢式 PCR, 对 PCR 产物的多个克隆进行测序, 以确定 miRNA 对靶基因的剪切位点<sup>[3]</sup>。

miRNA 积极参与植物整个生长发育进程的调控, 并且响应多种生物和非生物胁迫<sup>[4]</sup>。miR172 调控植物开花时间并积极响应多种非生物胁迫。拟南芥过表达大豆 miR172c 后, 表现出对盐和旱胁迫的耐受性<sup>[5]</sup>; 拟南芥过表达 miR393a 抑制生长素信号受体, 进而影响丁香假单胞菌的生长, 从而提高植株的细菌侵染抗性<sup>[6]</sup>; 干旱诱导番茄 miR169c 表达, 番茄过表达 miR169c 后, 气孔开放减少, 叶片失水率和蒸腾速率降低, 植株抗旱性明显增加<sup>[7]</sup>。miR166/165 在植物的生长发育中发挥着重要作用。目前, 至少 10 种植物中发现了 miRNA165/166 家族成员的存在<sup>[8]</sup>, miR166 通过靶向亮氨酸拉链同源结构域 (HD-ZIP III) 类转录因子调控植物腋生分生组织的起始和叶的发育<sup>[9]</sup>。Kim 等<sup>[10]</sup>在拟南芥中过表达 miR166a, 发现靶基因 *ATHB15* 表达量减少, 木质部和束间区扩大, 导致维管系统改变, 证明 miR166a 靶向切割 *ATHB15* 是拟南芥调节维管束发育的重要机制。Boualem 等<sup>[9]</sup>用原位杂交方法证明了 miR166 可以正确加工为成熟体发挥作用, 与

一些 HD-ZIP III 类转录因子基因 (*CNA/ATHB15/ICU4/ATHB8*) 在豆科植物根部表现出相同的空间表达特性, 证明 miR166 可以通过调控一些 HD-ZIP III 转录因子参与根的生长发育。研究表明 III 型同源结构域亮氨酸拉链蛋白参与拟南芥维管系统的分化与发育。拟南芥 HD-ZIP III 包括 5 个成员, 分别为 *ATHB15*、*ATHB8*、*PHAVOLUTA* (*PHV*)、*PHABULOSA* (*PHB*) 和 *REVOLUTA* (*REV*)。其中 *PHV*、*PHB* 和 *REV* 在植物的不同组织如维管组织、根尖、花分生组织和侧根近轴端等中均有表达<sup>[11-13]</sup>。*ATHB15* 和 *ATHB8* 主要分布在维管组织中, 暗示了其对于维管组织发育的重要作用<sup>[14-15]</sup>。miR166 同时响应多种非生物胁迫, miR166a 在毛白杨中响应水胁迫, 在拟南芥中施加 ABA 和盐处理后上调表达<sup>[16]</sup>, 番茄 miR166b 受低温诱导表达上调<sup>[17]</sup>, 暗示 miR166 在植物抵御非生物胁迫中扮演重要角色。

盐穗木为藜科多年生灌木, 是分布于中国西北地区的一种极端耐盐植物。本研究从盐穗木根的高盐胁迫 (600 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl) 的小 RNA 文库中, 候选差异表达的 miR166a, 从盐穗木转录组中预测了靶基因 *AHTB8-like*, 克隆获得盐穗木 miR166a 前体和 *ATHB8-like* 序列, 并通过生物信息学分析相应的前体和靶基因序列, 5' RLM-RACE 鉴定了盐穗木 miR166a 对 *AHTB8-like* 的靶向切割位点, 为进一步研究盐穗木 miR166a 和 *ATHB8-like* 的生物学功能奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

实验所用盐穗木种子采自新疆五家渠北沙窝干旱盐碱地, 选取籽粒饱满、大小均一的盐穗木种子, 加入 100 μL 次氯酸钠 (有效氯 ≥ 10%) 和 900 μL 无水乙醇灭菌消毒处理 8 min, 然后用无水乙醇反复冲洗 4~5 次, 待乙醇挥发后播种于 1/2 MS 培养基上, 置于温室 (16 h 光照/8 h 黑暗, 相对湿度 28%~50%, 温度 25 °C) 中培养。取生长近 60 d 的盐穗木幼苗, 迅速置入液氮中速冻后, 转入 -80 °C 保存

备用。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 提取总 RNA 及 cDNA 第一条链的合成** 使用植物总 RNA 提取试剂盒 (Tiangen, 北京) 和 RNA-Free DNase I (TaKaRa, Japan) 提取植物总 RNA, NanoDrop™ 分光光度计 (Gene Company Ltd) 及琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 浓度与纯度。用 M-MLV Reverse Transcriptase (TaKaRa, Japan) 合成 cDNA 第一链, 用于 miRNA 前体和靶基因 *ATHB8-like* 全长基因的克隆; 根据 SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, USA) 操作说明分别合成 5'-RACE 及 3'-RACE 的接头 cDNA。

### 1.2.2 盐穗木 miR166a 前体克隆及二级结构预测

根据盐穗木转录组数据库中获得的 miR166a 前体序列设计引物, 以盐穗木 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物经胶回收后连接 pMD18-T (TaKaRa, Japan) 载体上, 转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  (Tiangen, 北京), 挑取阳性单菌落送上海生工生物工程股份有限公司测序。盐穗木 miR166a 前体二级结构使用在线软件 Mfold 进行预测。登陆 miRBase 数据库下载部分已知 miR166a 的前体序列, 使用 MEGA5.0 构建 miR166a 前体系统进化树。

**1.2.3 靶基因 RACE 分析及全长基因克隆** 根据盐穗木转录组数据库中 *ATHB8-like* 的 EST, 参照 SMART RACE cDNA Amplification Kit 说明书, 利用软件 Primer Premier 5.0 分别设计了 2 条 5'-RACE 引物及 2 条 3'-RACE 引物 (表 1)。首先以

盐穗木 cDNA 为模板, 以通用引物 UPM 和外侧特异性引物 GSP1/GSP2 为引物, 分别进行第一轮 PCR 扩增反应, PCR 反应体系为 10 $\times$  Ex Taq Buffer 2  $\mu$ L, dNTP Mixture 3.2  $\mu$ L, cDNA 2  $\mu$ L, UPM 2.5  $\mu$ L, GSP1 或 GSP2 0.5  $\mu$ L, 用水补足体积至 20  $\mu$ L。反应程序为 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 68  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将第一轮 PCR 产物稀释 100 倍吸取 2  $\mu$ L 为模板, 再以通用引物 NUP 和内侧引物 NGSP1/NGSP2 为引物, 分别进行第二轮巢式 PCR, PCR 反应体系为 10 $\times$  Ex Taq Buffer 2  $\mu$ L, dNTP Mixture 2  $\mu$ L, 模板 2  $\mu$ L, NUP 0.5  $\mu$ L, NGSP1/NGSP2 0.5  $\mu$ L, 用水补足体积至 20  $\mu$ L。反应程序为 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 68  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将第二轮 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定, 切胶回收后连接到 pMD18-T (TaKaRa, Japan) 载体上, 转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  (Tiangen, 北京), 菌液 PCR 鉴定正确后, 挑取阳性单菌落送上海生工生物工程股份有限公司测序。根据对已知 EST 和获得的 5' cDNA 及 3' cDNA 序列进行拼接的结果设计基因全长引物, 以普通 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应程序为 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 64  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。产物回收后连接到 pEASY-T1 (Transgen, 北京) 载体上, 转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  (Tiangen, 北京), 菌液 PCR 鉴定正确后, 挑取阳性单菌落送上海

表 1 实验所用引物序列

Table 1 Primer sequences used in the experiments

名称 Name	引物 Primer	引物序列 Primer Sequence (5'-3')	扩增产物 Product
miR166a	miR166a-F ( <i>Sac</i> I)	GAGCTCGAGAGAAACAGCAGAAGTG	盐穗木 miR166a 前体 <i>Halostachys caspica</i> miR166a precursor
	miR166a-R ( <i>Sal</i> I)	GTCGACGATTCTCTCGTATCCTGC	
<i>ATHB8-like</i>	<i>ATHB8-like</i> -GSP1	CGGTTCCAGTTGCCTTCGAAAGAAACTC	5'-RACE 扩增产物 5'-RACE amplified product
	<i>ATHB8-like</i> -NGSP1	GAGGACGCTGGGTAGTAGTTTGTGTGATGG	
	<i>ATHB8-like</i> -GSP2	CATCAACAAACTACTACCCAGCGTCCTCC	
	<i>ATHB8-like</i> -NGSP2	GCTGTTGAGTGGATCCAAATGCCTG	3'-RACE 扩增产物 3'-RACE amplified product
	<i>ATHB8-like</i> -F	GAGGAATTTCAAGATTGAAGTGAGTG	
	<i>ATHB8-like</i> -R	GGGTCTAAACTGTAGAAGAATGTCCC	<i>ATHB8-like</i> 基因全长 <i>ATHB8-like</i> full length
	UPM (Long)	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	
UPM (Short)	CTAATACGACTCACTATAGGGC		
	NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	
5'RLM-RACE	<i>ATHB8-like</i> -RLM-GSP1	CGCATATCAGACACTACCATCTTCTAG	miR166a 对盐穗木 <i>ATHB8-like</i> 剪切位点的克隆 the clone of <i>Halostachys caspica</i> <i>ATHB8-like</i> cleavage site by miR166a
	<i>ATHB8-like</i> -RLM-GSP2	CACATTCATCACATCCACAGCTCG	
	5'RACE Outer Primer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA	
	5'RACE Inner Primer	CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG	

生工生物工程股份有限公司测序。利用 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)对测序结果进行 BLAST。DNAMAN 软件进行序列信息分析。

**1.2.4 5' RLM-RACE 分析** 以盐穗木总 RNA 为模板,按照 5'-Full RACE Kit(TaKaRa, Japan)说明书,完成 cDNA 第一链的合成及接头添加。以接头 cDNA 为模板,外侧特异性引物和外侧通用引物进行 PCR 反应。反应体系为:接头 cDNA 1  $\mu\text{L}$ , 1 $\times$  cDNA Dilution Buffer II 4  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$  LA PCR Buffer II (Mg<sup>2+</sup> Free) 2  $\mu\text{L}$ , MgCl<sub>2</sub> (25 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 1.5  $\mu\text{L}$ , LA Taq(5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.125  $\mu\text{L}$ , 5'-RACE Control Outer Primer(10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , 5'-RACE Outer Primer(10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 14.375  $\mu\text{L}$ , 总体积 25  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件如下:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 20 个循环, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。以第一轮 PCR 产物为模板进行内侧 PCR, 反应体系为: Outer PCR 反应液 0.5  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$  LA PCR Buffer II (Mg<sup>2+</sup> Free) 2.5  $\mu\text{L}$ , MgCl<sub>2</sub> (25 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 2.5  $\mu\text{L}$ , dNTP Mixture(2.5 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 4  $\mu\text{L}$ , LA Taq(5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.25  $\mu\text{L}$ , 5'-RACE Control Inner Primer(10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , 5'-RACE Inner Primer(10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 13.25  $\mu\text{L}$ , 总体积 25  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件如下:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 25 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。反应结束后, 取适量 PCR 反应液进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 引物序列见表 1。

## 2 结果与分析

### 2.1 盐穗木 miR166a 前体克隆及序列分析

#### 2.1.1 盐穗木 miR166a 前体克隆及二级结构预测

高盐胁迫下盐穗木根的小 RNA 文库中 miR166a 下调 0.61 倍, 利用盐穗木转录组数据筛选到 miR166a 的前体序列(pre-miR166a), 进行引物设计, 从盐穗木 cDNA 中扩增其前体序列(图 1)。盐穗木 pre-miR166a 序列长为 215 bp, 使用 Mfold ([\[afold.rna.albany.edu/?q=mfold\]\(http://afold.rna.albany.edu/?q=mfold\)\) 在线预测其二级结构, 盐穗木 pre-miR166a 可折叠成合适的颈环结构, 最小折叠自由能\(MEF\)为 -43.4 kcal/mol, 最小折叠自由能指数\(MFEI\)为 0.85。miR166a 成熟体序列位于颈环结构的一条臂上, miRNA 与 miRNA\\* 碱基错配只有 4 个\(图 2\), 符合 miRNA 前体的预测原则。](http://un-</a></p>
</div>
<div data-bbox=)

#### 2.1.2 盐穗木 miR166a 成熟体和前体的序列分析

对 miRbase 中不同植物的 miR166a 成熟体序列与盐穗木 miR166a(HcmiR166a) 进行比对, 发现除了葡萄 VvimiR166a 与 HcmiR166a 的成熟体有一个碱基的差异, 其他物种如拟南芥 AthmiR166a, 水稻 OsamiR166a, 高粱 SbimiR166a 以及蒺藜苜蓿 MtrmiR166a 等与盐穗木 HcmiR166a 的成熟体完全一致(图 3), 表明 miR166a 成熟体在不同物种中保守性较高。使用软件 MEGA5.0 对盐穗木 pre-miR166a 进行系统进化树分析, 结果显示禾本科植物中的水稻 OsamiR166a 与高粱 SbimiR166a 聚为一支, 十字花科拟南芥 AthmiR166a 与油菜 BnamiR166a 聚为一支, 但豆科 GmamiR166a 与蒺藜苜蓿 MtrmiR166a、禾本科玉米 ZmamiR166a 与二穗短柄草 BdimiR166a 并未聚集(图 4), 盐穗木 miR166a 与其他物种 miR166a 同源性较低, 推测主要是基于目前藜科物种 miR166a 信息的有限性造成的。

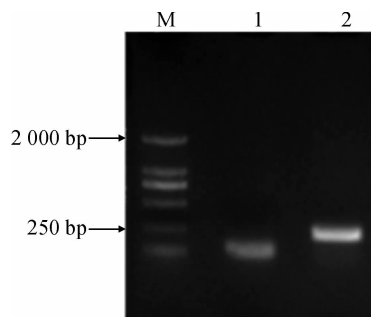
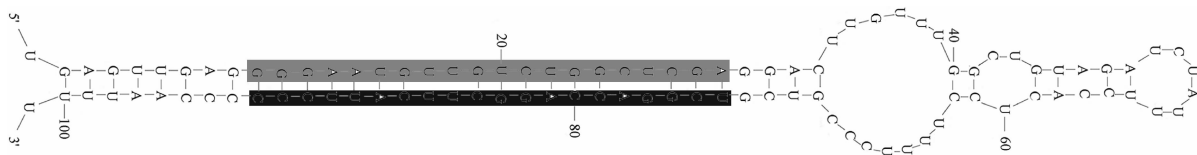


图 1 盐穗木 miR166a 前体的扩增

Fig. 1 Amplification of *Halostachys caspica* miR166a precursor



黑色表示 miRNA, 灰色表示 miRNA\*

图 2 盐穗木 miR166a 前体二级结构预测

Mature sequence is marked by black; miRNA\* is marked by gray

Fig. 2 Secondary structure of *H. caspica* miR166a precursor

### 2.2 预测的靶基因 *ATHB8-like* 的克隆和序列分析

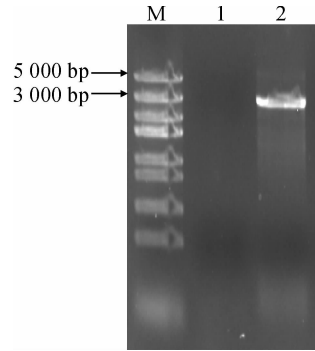
植物 miRNA 通过与靶基因序列的互补配对实现对靶基因的切割降解或翻译抑制。采用生物信息学方法,从盐穗木转录组中预测了 miR166a 的靶向序列为 *ATHB8-like*。通过预测的靶基因 EST 序列设计 5' / 3' RACE 引物,以盐穗木 cDNA 为模板进行扩增,分别获得了 5' 端 630 bp 和 3' 端 2 284 bp 大小的产物。根据预测到的盐穗木靶基因 EST 和 5' 端及 3' 端测序正确的结果进行全长拼接,进而

设计引物进行全长克隆,获得 2 786 bp 的全长基因序列(图 5),命名为 *ATHB8-like*。使用 NCBI Conserved Domain Search([http:// www. ncbi. nlm. nih. gov/Structure/cdd/wrpsb. cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi))在线预测其保守域,盐穗木 *ATHB8-like* 包含一个 HD-ZIP III 结构域(图 6)。不同植物 *ATHB8* 编码蛋白的系统进化树分析显示,蔷薇科梅花 *PmuATHB8*、苹果 *MdoATHB8* 和草莓 *FveATHB8* 聚为一支,葫芦科青瓜 *CsaATHB8* 与甜瓜 *CmeATHB8* 聚为一支,豆

AthmiR166a	TCGGACCAGGCTTCATTCC
BdimiR166a	TCGGACCAGGCTTCATTCC
BnamiR166a	TCGGACCAGGCTTCATTCC
GmamiR166a	TCGGACCAGGCTTCATTCC
MtrmiR166a	TCGGACCAGGCTTCATTCC
OsamiR166a	TCGGACCAGGCTTCATTCC
PtcmiR166a	TCGGACCAGGCTTCATTCC
SbimiR166a	TCGGACCAGGCTTCATTCC
SlymiR166a	TCGGACCAGGCTTCATTCC
VvimiR166a	TCGGACCAGGCTTCATTCC
ZmamiR166a	TCGGACCAGGCTTCATTCC
HcmiR166a	TCGGACCAGGCTTCATTCC
Consensus	t c g g a c c a g g c t t c a t t c c

图 3 不同植物 miR166a 成熟体序列比对

Fig. 3 The alignment of miR166a mature sequences from plant species



M. 5 000 bp marker; 1. 阴性(未加模板); 2. *HcATHB8-like* 基因全长的扩增

图 5 盐穗木 *ATHB8-like* 全长基因的扩增

1. Negative control; 2. Full length of *HcATHB8-like*  
Fig. 5 Amplification of *H. caspica ATHB8-like* full length

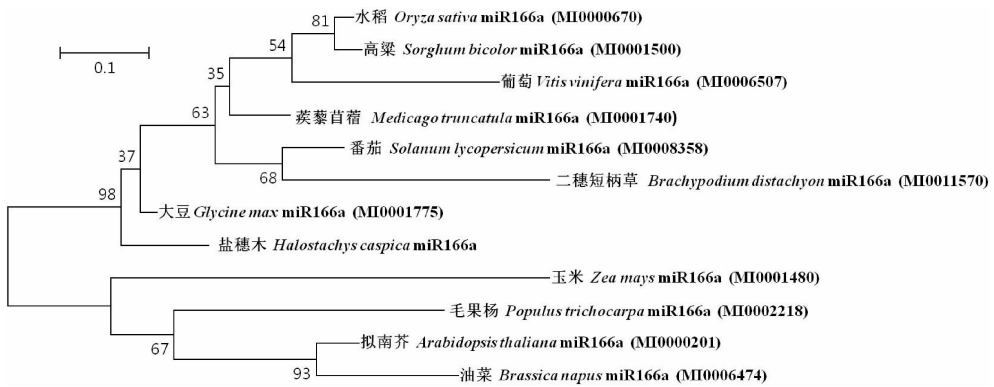


图 4 盐穗木与其他植物种 miR166a 前体序列的系统进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic tree analysis of *H. caspica* miR166a precursor with those of other plant species

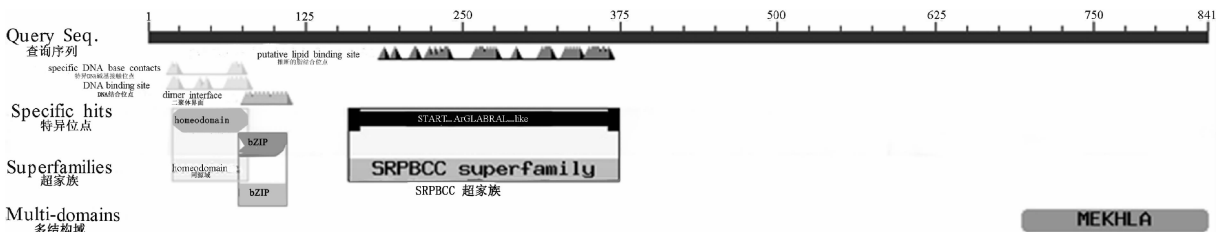


图 6 盐穗木 *ATHB8-like* 蛋白保守结构域预测

Fig. 6 The prediction of *H. caspica ATHB8-like* conservative domain

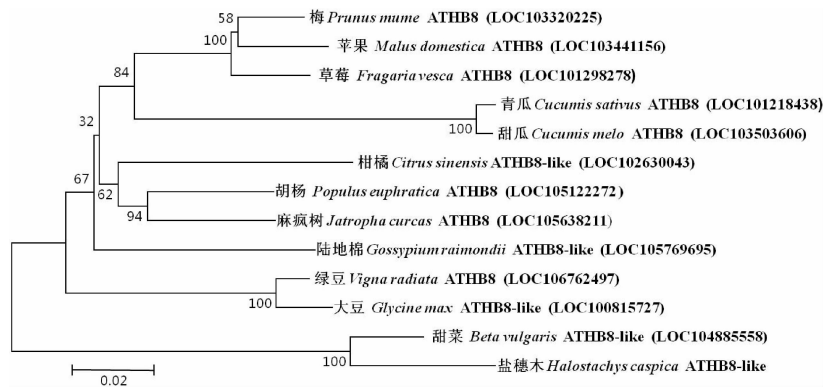


图7 盐穗木 ATHB8-like 与其他植物 ATHB8 氨基酸序列的系统进化树分析

Fig. 7 Phylogenetic tree analysis of *H. caspica* ATHB8-like with ATHB8 of other plant species

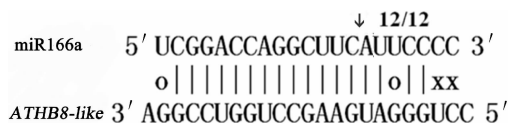


图8 5'RLM-RACE 验证盐穗木 miR166a 对预测靶基因 *ATHB8-like* 的靶向切割

Fig. 8 Validation of miR166a guided cleavage of target gene *ATHB8-like* by 5' RLM-RACE in this species

科绿豆 *VraATHB8* 和大豆 *GmaATHB8* 聚为一支, 藜科盐穗木 *HcATHB8-like* 与甜菜 *BvATHB8-like* 聚为一支(图7), 同科属植物的 *ATHB8-like* 在氨基酸序列上具有一定的一致性, 表明 *ATHB8-like* 在进化上较为保守。

### 2.3 盐穗木 miR166a 对预测靶基因 *ATHB8-like* 的切割鉴定

miRNA 对靶基因的调控方式有两种: 剪切降解和翻译抑制<sup>[2]</sup>。基于完整 mRNA 和被 miRNA 作用过的 mRNA 的 5' 端结构的不同, 使用 RNA 连接酶介导的 5' RLM-RACE, 通过测序确定 miR166a 对 *ATHB8-like* 切割位点。测序结果表明, 12 个样品结果一致, 盐穗木 miR166a 对 *ATHB8-like* 的剪切位点位于第 14~15 个碱基之间, 这表明 miR166a 可以在转录水平调控 *ATHB8-like* 的表达(图8)。

## 3 讨论

研究表明, 从人类到动物, 从苔藓植物到开花植物, 许多 miRNA 在进化上高度保守<sup>[18-20]</sup>。Zhang 等<sup>[8]</sup>在研究植物 miRNA 的保守性时认为 miR165/miR166 具有高度保守性, 这与本结果一致, 在所选的 12 个物种中除葡萄外的 11 个物种中 miR166a 的成熟体完全相同。

一些实验表明, 植物 miRNA 参与调节植物多种生长发育进程, 包括叶形态的发生, 花的分化与发育, 根的延伸与生长以及维管发育等, 并且多数 miRNA 是通过靶向调节一些转录因子的表达实现其调控功能<sup>[8]</sup>, 本研究通过 5' RLM-RACE 验证了盐穗木 miR166a 对 *ATHB8-like* 的靶向切割作用, 这与 Lertpanyasampatha 等<sup>[21]</sup>的研究结果是一致的, 橡胶树 miR166 对靶基因 HD-ZIP III 类转录因子具有靶向切割作用。

目前关于 miR166 的功能研究主要集中在植物的生长发育过程。在拟南芥中, miR166a 介导的 *ATHB15* mRNA 的剪切作用是拟南芥调控维管发育的主要机制<sup>[10]</sup>; Jung 等<sup>[22]</sup>发现 miR165/miR166 基因通过动态表达模式调控拟南芥茎端分生组织和花的发育; 在豆科植物藜蒺苜蓿中 miR166a (*MtmiR166a*) 与其靶基因 HD-ZIP III 在维管束以及根顶端部位和根瘤中均有表达, 过表达 *MtmiR166a* 降低转录因子 HD-ZIP III 基因的表达, 导致转基因植株根瘤和侧根数量减少以及根维管束的异位发展<sup>[9]</sup>。

miR166 在植物抵御非生物胁迫方面的研究较少。Xie 等<sup>[23]</sup>通过深度测序鉴定了棉花中响应盐和旱胁迫的 miRNA, 其中 miR166 家族成员在盐、旱胁迫下均下调表达, 且在不同胁迫处理下表现出显著的表达差异, 暗示了 miR166 在棉花响应盐、旱胁迫中的重要作用。

盐穗木是一种极端耐盐植物。本文利用 PCR 技术获得盐穗木 miR166a 的前体序列, 不同植物 miR166a 成熟体高度保守; 通过 RACE 技术克隆了预测的靶基因 *ATHB8-like* 的全长序列并进行了初步的信息学分析; 通过 5' RLM-RACE 鉴定了盐

穗木 miR166a 对 *ATHB8-like* 的靶向切割位点在 14~15 碱基之间。本研究结果为后期开展盐穗木

miR166a 和 *ATHB8-like* 的生物学功能奠定基础。

### 参考文献:

- [1] CUPERUS J T, FAHLGREN N, CARRINGTON J C. Evolution and functional diversification of MIRNA genes [J]. *Plant Cell*, 2011, **23**(2): 431-442.
- [2] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, **116**(2): 281-297.
- [3] 易小娅, 杨瑞瑞, 曾幼玲. 植物 miRNA 的研究方法概述[J]. *植物生理学报*, 2015, **51**(4): 413-423.
- YI X Y, YANG R R, ZENG Y L. Overview of research methods for plant miRNAs[J]. *Plant Physiology Journal*, 2015, **51**(4): 413-423.
- [4] ZHANG B H, WANG Q L. MicroRNA-based biotechnology for plant improvement[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2015, **230**(1): 1-15.
- [5] LI W B, WANG T, ZHANG Y H, *et al.* Overexpression of soybean miR172c confers water deficit and salt tolerance but ABA sensitivity in transgenic *Arabidopsis thaliana*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2016, **67**(1): 175-194.
- [6] NAVARRO L, DUNOYER P, JAY F *et al.* A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling[J]. *Science*, 2006, **312**(5 772): 436-439.
- [7] ZHANG X H, ZOU Z, GONG P J, *et al.* Over-expression of microRNA169 confers enhanced drought tolerance to tomato [J]. *Biotechnology Letters*, 2011, **33**(2): 403-409.
- [8] ZHANG B H, PAN X P, CANNON C H, *et al.* Conservation and divergence of plant microRNA genes[J]. *Plant Journal*, 2006, **46**(2): 243-259.
- [9] BOUALEM A, LAPORTE P, JOVANOVIĆ M, *et al.* MicroRNA166 controls root and nodule development in *Medicago truncatula*[J]. *Plant Journal*, 2008, **54**(5): 876-887.
- [10] KIM J, JUNG J H, REYES J L, *et al.* microRNA-directed cleavage of *ATHB15* mRNA regulates vascular development in *Arabidopsis* inflorescence stems[J]. *Plant Journal*, 2005, **42**(1): 84-94.
- [11] MCCONNELL J R, EMERY J, ESHED Y, *et al.* Role of PHABULOSA and PHAVOLUTA in determining radial patterning in shoots[J]. *Nature*, 2001, **411**(6 838): 709-713.
- [12] EMERY J F, FLOYD S K, ALVAREZ J, *et al.* Radial patterning of *Arabidopsis* shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes[J]. *Current Biology*, 2003, **13**(20): 1 768-1 774.
- [13] OTSUGA D, DEGUZMAN B, PRIGGE M J, *et al.* REVO-LUTA regulates meristem initiation at lateral positions[J]. *Plant Journal*, 2001, **25**(2): 223-236.
- [14] BAIMA S, NOBILI F, SESSA G, *et al.* The expression of the *Athb-8* homeobox gene is restricted to provascular cells in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Development*, 1995, **121**(12): 4 171-4 182.
- [15] OHASHI-ITO K, FUKUDA H. HD-*zip* III homeobox genes that include a novel member, *ZeHB-13* (*Zinnia*)/*ATHB-15* (*Arabidopsis*), are involved in procambium and xylem cell differentiation[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2003, **44**(12): 1 350-1 358.
- [16] JIA X Y, WANG W X, REN L G, *et al.* Differential and dynamic regulation of miR398 in response to ABA and salt stress in *Populus tremula* and *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Molecular Biology*, 2009, **71**(1): 51-59.
- [17] VALIOLLAHI F, FARSI M, KAKHKI A M. Sly-miR166 and Sly-miR319 are components of the cold stress response in *Solanum lycopersicum* [J]. *Plant Biotechnology Reports*, 2014, **8**(4): 349-356.
- [18] AXTELL M J. Evolution of microRNAs and their targets: are all microRNAs biologically relevant? [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2008, **1 779**(11): 725-734.
- [19] WEBER M J. New human and mouse microRNA genes found by homology search[J]. *The FEBS Journal*, 2005, **272**(1): 59-73.
- [20] LUO Y, GUO Z H, LI L. Evolutionary conservation of microRNA regulatory programs in plant flower development [J]. *Developmental Biology*, 2013, **380**(2): 133-144.
- [21] LERTPANYASAMPATHA M, VIBOONJUN U, KONGSAWADWORAKUL P, *et al.* Differential expression of microRNAs and their targets reveals a possible dual role in physiological bark disorder in rubber tree [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2014, **171**(13): 1 117-1 126.
- [22] JUNG J H, PARK C M. MIR166/165 genes exhibit dynamic expression patterns in regulating shoot apical meristem and floral development in *Arabidopsis* [J]. *Planta*, 2007, **225**(6): 1 327-1 338.
- [23] XIE F L, WANG Q L, SUN R R, *et al.* Deep sequencing reveals important roles of microRNAs in response to drought and salinity stress in cotton [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, **66**(3): 789-804.

(编辑:宋亚珍)