

水稻 Os-miR390 前体基因的克隆、载体构建及转化

鲁玉柱, 封 振, 边黎颖, 梁建生

(扬州大学 生物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009)

【摘要】 **【目的】** microRNA 是一类长度为 21~23 nt 的非编码小分子 RNA, 对动植物的正常发育具有非常重要的调节作用。水稻 Os-miR390 的功能可能与生长素应答相关, 拟采用转基因方法研究其生物学功能。**【方法】** 根据水稻 Os-miR390 的前体 RNA 结构特点合理设计引物, 从水稻基因组中克隆出其前体 DNA 片段, 将其构建在玉米 UbiI 启动子驱动的表达载体中, 并转入水稻。**【结果】** 利用 PCR 成功地从水稻基因组中扩增出了 Os-miR390 前体基因, 并将其构建在 UbiI 水稻组成型启动子下。经农杆菌介导, 将其成功转入水稻愈伤, 获得抗性幼苗, 经过 PCR 检测, 得到阳性转基因植株。**【结论】** T₀ 代转基因植株表现叶片黄化的特征, 待 T₁ 至 T₂ 代性状稳定后结合研究靶基因可深入研究其功能。

【关键词】 microRNA; 水稻; 基因克隆; Os-miR390 前体基因

【中图分类号】 Q785

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)08-0087-05

Cloning and constructing of Os-miR390 precursor gene and transforming it into rice

LU Yu-zhu, FENG Zhen, BIAN Li-ying, LIANG Jian-sheng

(College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

Abstract: **【Objective】** MicroRNAs are a class of about 21—23 nt, non-coding, and small RNA that play important roles in the development of plants and animals. The roles of Os-miR390 may be related with Auxin response. Here transgenic methods were used to explore the function of Os-miR390 in rice. **【Method】** Using the molecular cloning methods to clone, construct the precursor of Os-miR390 and transform it into rice. **【Result】** The precursor DNA of Os-miR390 from rice genomic DNA was successfully amplified and constructed under the Ubiquitin I constitutive promoter. Thereafter it was introduced into rice mediated by *Agrobacterium* and the positive transgenic plants were gained by PCR. **【Conclusion】** Although the T₀ transgenic plants show a phenotype of yellow leaf, the roles of miR390 can be explored in-depth through combining the research of the target genes after the traits of T₁ to T₂ have stabilized.

Key words: microRNA; rice; gene cloning; Os-miR390 precursor gene

近年来, 在动植物体内发现了一批具有重要调节功能的非编码小分子 RNA, 亦即 microRNA^[1]。2002 年, 植物中的 microRNA 首次于拟南芥中进行了克隆鉴定^[2-4]。基于生物信息学手段, 植物 microRNA 的靶基因多数被认为是转录因子, 表明其与植物的生长发育有非常密切的联系^[5]。研究表

明, 植物 microRNA 在个体发育过程中具有非常重要的调节作用^[6]。

目前, 采用克隆和信息学手段, 在拟南芥和水稻中均鉴定出了 miR390^[7-9]。在拟南芥中, at-miR390 的靶基因为 TAS3, 其是 ta-siRNA 的前体基因。该基因在 miR390 的介导下产生系列 ta-siRNA, 其作

* [收稿日期] 2008-11-12

[基金项目] 扬州大学博士启动基金项目(0288900015230)

[作者简介] 鲁玉柱(1972—), 男, 陕西富县人, 副教授, 主要从事植物发育分子生物学研究。E-mail: luyuzhu@yzu.edu.cn

[通信作者] 梁建生(1961—), 男, 江苏海门人, 教授, 博士生导师, 主要从事植物抗逆研究。E-mail: jsliang@yzu.edu.cn

用于生长素响应因子 (ARF3 和 ARF4) 的 mRNA^[10]。在水稻中根据生物信息学预测其靶基因为富含亮氨酸的蛋白质^[8], 该蛋白质的功能未知。由于 microRNA 及其靶基因的共同保守性, 可以拟南芥为依据推测水稻中 miR390 及靶基因可能与生长素应答途径相关。在苔藓类(最古老的一种陆地植物)中也能检测到 miR390 的存在, 说明这一机制在高等植物进化的早期就已存在^[11]。

目前, 揭示 microRNA 功能的基本方法之一是过量表达植物 microRNA, 从而得到相关的突变体, 进而通过对突变体表型的分析来确定其功能。基于此法, 在拟南芥中已获得系列重要成果^[6]。microRNA 通过动植物体内的 Dicer 酶切割其具有茎环式结构的前体 RNA 而形成^[1]。本研究根据水稻 Os-miR390 的前体 RNA 结构特点, 合理设计引物, 从水稻基因组中成功克隆出其前体 DNA 片段, 并将其构建在玉米 Ubi1 启动子驱动的表达载体中, 成功转入水稻, 以期得到相关的突变体, 通过分析突变体表型及揭示突变分子机理阐明 Os-miR390 的功能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 水稻受体品种 水稻品种为‘日本晴 Nipponbare (*Oryza sativa* L.)’, 为扬州大学植物抗逆实验室保存, 该品种的基因组序列已知。

1.1.2 农杆菌菌株及质粒 本研究所使用的根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 为菌株 EHA 105, 所使用的表达载体为双元载体 pCAM-BIA1301, 大肠杆菌 DH5 α 为扬州大学植物抗逆实验室保存, 载体 pUC18 购自 Promega 公司, Taq DNA 聚合酶购自上海生工生物工程技术服务有限公司。

1.1.3 水稻组织培养 水稻愈伤组织所用系列培养基分别为: 组织培养为 N6D, 共培养为 N6-2AS, 选择培养基为 N6D(含潮霉素 50 mg/L 和头孢霉素 400 mg/L), 分化培养基为 MS 培养基(含潮霉素 50 mg/L 和头孢霉素 400 mg/L)。供试的愈伤组织是以水稻种子萌发后作为外植体, 用于愈伤组织的诱导及随后的转化。

1.2 方法

1.2.1 Os-miR390 前体基因片段的克隆和构建 根据已知的 Os-miR390 的发夹式结构序列 (<http://microna.sanger.ac.uk/cgi-bin/sequences/browse.pl>),

在 database 中查阅其所在基因组位点的两侧序列, 分别于发夹式结构两端外约 10 bp 处人工设计引物。根据表达载体的酶切位点, 于 5' 端正向引物引入 BamH I 酶切位点(下划线处), 3' 端反向引物引入 Sac I 酶切位点(下划线处), 所设计的引物序列如下。Os-miR390 正向引物: AA GGATCCGAG-AGATGTTTTGAGGAAGGG, 简称为 Os-miR390F; Os-miR390 反向引物: GCGAGCTCATTTAATTGGTCGTGTGGTAAG, 简称 Os-miR390R。在 25 μ L 的 PCR 反应体系中, 正、反向引物各 25 pmol, dNTP 为 2.5 mmol, 模板为 100 ng 水稻总 DNA, Taq DNA 聚合酶 2 U。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 60 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 60 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 共 35 个循环。将扩增出的 PCR 产物构建入克隆载体 pUC18 中, 测序, 酶切, 与表达载体连接, 转化 DH5 α , 提取质粒。

1.2.2 根癌农杆菌的培养及其介导的水稻转化 根癌农杆菌的培养及水稻转化参考 Hiei 等^[12]的方法。

1.2.3 转基因水稻植株总 DNA 的 PCR 鉴定 水稻植株总 DNA 的提取参照 Murray 等^[13]的方法。PCR 引物分别为 Ubi1 启动子 3' 端正链末端序列及 Os-miR390 的 3' 端负链末端序列 (P1: CGGTCGTTCATTCGTTCTAG; Os-miR390R: GCGAGCTCATTTAATTGGTCGTGTGGTAAG), 中间扩增片段的长度约为 160 bp。

2 结果与分析

2.1 水稻 Os-miR390 前体基因的获得

Os-miR390 在水稻基因组中只有 1 个位点, 据生物信息学预测, 于该位点两侧能形成茎环结构。根据已知的基因组序列, 拟采用 PCR 扩增出 Os-miR390 的序列, 预期得到的前体片段的长度为 143 bp。以水稻品种日本晴的基因组总 DNA 为模板, 用引物 Os-miR390F 和 Os-miR390R 进行 PCR 扩增, 获得了 1 条与预期片段大小一致的专一条带(图 1)。将该 PCR 产物接入 pUC18, 获得含有目的片段的重组 pUC18 质粒, 经测序, 所得序列与预期序列有 100% 的同源性, 表明已成功克隆出 Os-miR390 基因序列。

将含有目的片段的重组 pUC18 质粒用 BamH I 和 Sac I 双酶切(图 2), 获得目的片段, 回收目的片段构建表达载体。

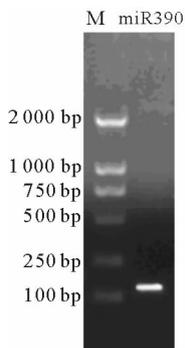


图 1 Os-miR390 前体基因序列的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of the precursor DNA of Os-miR390

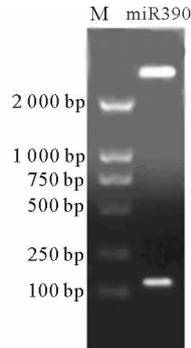


图 2 重组质粒的酶切鉴定结果

Fig. 2 Characterization of the recombinant plasmids after digestion with restriction enzymes

2.2 含 Os-miR390 前体基因片段表达载体的构建

将经双酶切回收的目的片段构建入表达载体 pCAMBIA1301 中(图 3)。该载体的 T2DNA 区含有 35S 驱动的潮霉素抗性基因及 35S 驱动的 GUS 基因, 目的基因上游为玉米 UbiI 启动子, 两侧含有 BamH I 和 Sac I 酶切位点, 下游与 NOS 终止子连接(图 3)。在拟南芥中, 组成型表达 microRNA 往往用到 35S 启动子^[6], 但在单子叶植物中, 玉米

UbiI 启动子是强有力的组成型启动子^[14]。植物 microRNA 功能研究的基本方法之一是组成型过量表达植物 microRNA 基因, 在水稻中利用 UbiI 启动子组成型过量表达 microRNA 基因无疑是最佳选择。所构建的 Os-miR390 表达载体经 PCR 和酶切鉴定后, 用于转化农杆菌 EHA 105, 并进一步转化水稻。

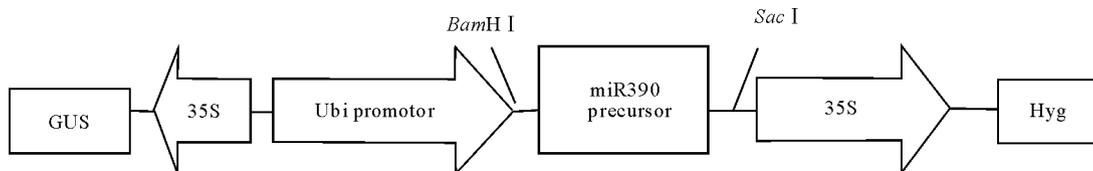


图 3 二元载体 pCAMBIA1301 的 T2DNA 区的结构

Fig. 3 Structure of T2DNA region in binary vector of pCAMBIA1301

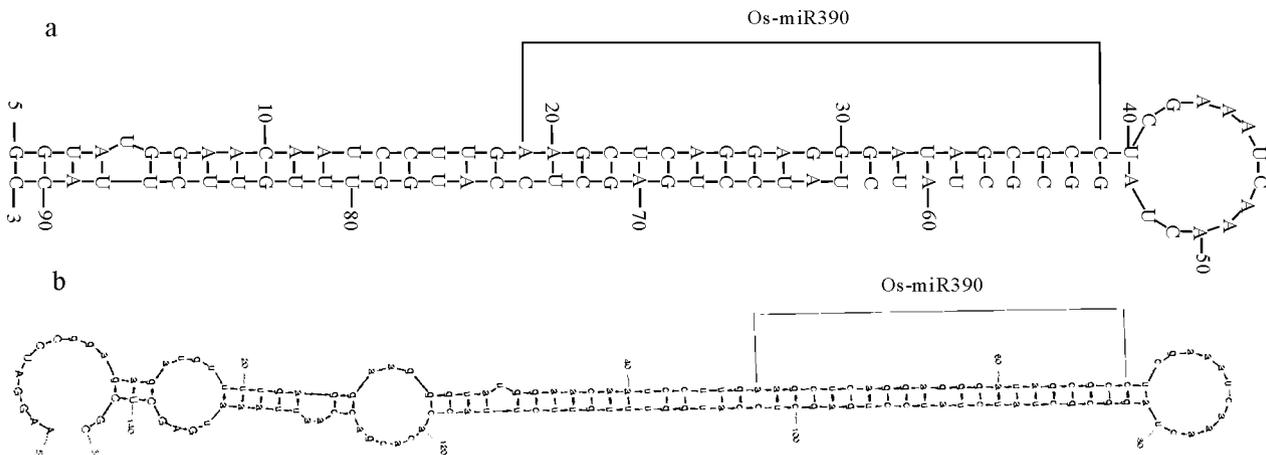


图 4 用 mfold 软件预测 Os-miR390 前体基因片段经转录后所形成的茎环结构

a. database 中 Os-miR390 前体茎环的结构; b. PCR 扩增片段转录后的茎环结构

Fig. 4 Predicted stem-loop of Os-miR390 precursor gene fragment after transcription by mfold program

a. The stem-loop of Os-miR390 in database; b. The stem-loop of fragment amplified by PCR after transcription

2.3 Os-miR390 前体基因表达所形成茎环结构的预测

microRNA 前体基因经转录后需形成 1 个茎环结构,才能被植物体内的 Dicer 酶所识别并切割,进而产生相应的 microRNA^[1]。本研究所设计的引物长度为 28 个碱基,除保护碱基和酶切位点外,在原始的茎环臂部外又取了 10 个碱基,使目的片段较 database 中的茎环结构(图 4a)多了 30 多个碱基,其中酶切位点和保护碱基(16 bp)是外加的,不属于其基因组序列。经 mfold 程序分析后^[15],该片段同样形成茎环结构(图 4b),且两者除臂部的长短有所不同外,其余部分完全一致,包括 miR390 所在位置(图 4)。说明所扩增的片段区域没有影响其二级结构的形成,亦即不会影响 microRNA 的产生。

2.4 转基因幼苗的获得及表型

以粳稻‘日本晴’种子分化形成的愈伤组织为转化受体,经农杆菌介导,将 Os-miR390 前体基因导入水稻中,经潮霉素(hygromycin B)抗性筛选获得了大量的转基因水稻植株。提取抗性幼苗的基因组 DNA,以其为模板进行 PCR 鉴定,结果如图 5 所示。图 5 显示,所扩增的片段长度约为 160 bp。以来源于原始单个愈伤组织的绿苗作为独立的株系进行 PCR 鉴定,选取确定无疑的条带(图 5A)所代表的株系作为阳性转基因植株继续培育,以作后续筛选突变体之用。与野生型相比, T_0 代的阳性转基因植株略矮小,黄化的叶片数较少,但对比不明显(图 5B),其稳定的表型需要在 T_1 至 T_2 代进一步确定。

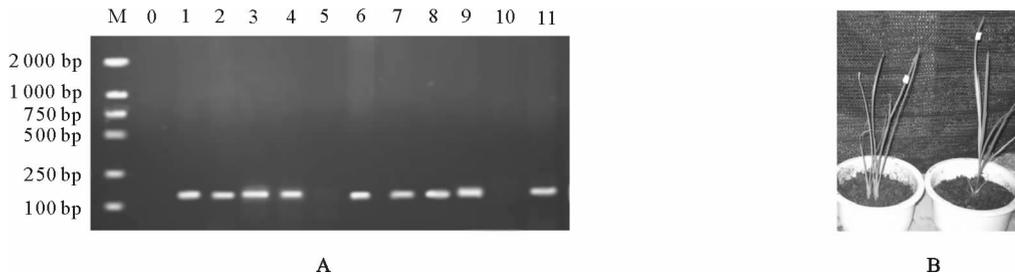


图 5 转基因水稻的鉴定及 T_0 幼苗的表型

A. 转基因水稻总 DNA 的 PCR 分析;M. Maker;0. 野生型;1~11. 具有抗性的 T_0 代株系;

B. T_0 转基因水稻的表型:左为转基因植株;右为野生型

Fig. 5 Identification and the phenotype of T_0 transgenic rice

A. PCR analysis of the total DNA from transgenic rice;M. Maker;0. Wildtype;

1-11. Lane represent the different T_0 seedlings which resist to hygromycin;

B. The phenotype of T_0 transgenic rice; T_0 transgenic rice in left;Wild type in right

3 讨论

基因的过量表达是研究特定基因功能的基本手段之一,对植物 microRNA 而言,目前还没有一个比较成熟的方法使得某个特定的 microRNA 不表达,因此过量表达 microRNA 是研究其功能的重要手段。但在植物中,揭示 microRNA 功能的研究主要集中在拟南芥中,水稻中几乎没有相关的报道^[6],这与水稻转基因相对困难有很大关系。

关于茎环结构的长度取舍,有研究报道取舍茎环以外 1 kb 以上的片段进行转化^[16],也有报道仅取茎环临近处即可^[17],本研究采用后者。在设计引物时,为了防止在 PCR 退火时原来的茎环结构阻碍引物与模板的结合,本研究设计引物时在茎环结构两侧外约 10 bp 处开始,经 mfold 分析发现,扩增片

段忠实地维持了原来的茎环结构,亦即不会影响天然 microRNA 的产生。

Os-miR390 在拟南芥、水稻和玉米中的表达已经得到了 Northern Blot 证实^[7-9]。最近,有研究表明 miR390 和 AG07 特异性结合,并以 2 种方式介导 ta-siRNA 的产生^[18],进而以产生的系列 ta-siRNA 作用靶基因。此种模式扩大了 microRNA 的作用力度,表明该 microRNA 对其靶基因通过 siRNA 高度抑制后才得以维持植物正常发育。在水稻中,miR390 在根部与幼苗中的转录量较高,这可能与幼苗及根部生长素信号传导相关^[8]。研究表明,mi-croRNA 在生物体内的表达遵循严密的程序,具有一定的时空特异性,从而行使它们对动植物体有序发育的功能^[6]。本研究通过在水稻组成型启动子下表达 microRNA 的前体序列,从而过量表达 mi-

croRNA 而打破其自身的遗传机制,获得与水稻发育相关的突变体。但作为阶段性的工作,虽然得到了 T_0 代转基因植株,并具有一定的表型,但要进一步研究其功能,还要继续繁育转基因植株到 T_1 代甚至 T_2 代,根据转基因植株纯合体稳定下的表型特征,结合研究其靶基因,以全面揭示 Os-miR390 对水稻发育的功能,这些有待于进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] He L, Hannon G J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation [J]. Nat Rev Genet, 2004, 5: 522-531.
- [2] Park W, Li J, Song R, et al. Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana* [J]. Curr Biol, 2002, 12: 1484-1495.
- [3] Reinhart B J, Weinstein E G, Rhoades M W, et al. MicroRNAs in plants [J]. Genes Dev, 2002, 16: 1616-1626.
- [4] Llave C, Kasschau K D, Rector M A, et al. Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants [J]. Plant Cell, 2002, 14: 1605-1619.
- [5] Rhoades M W, Reinhart B J, Lim L P, et al. Prediction of plant microRNA target [J]. Cell, 2002, 110: 513-520.
- [6] Jones-Rhoades M W, Bartel D P, Bartel B, et al. MicroRNAs and their regulatory roles in plants [J]. Annu Rev Plant Biol, 2006, 57: 19-53.
- [7] Adai A, Johnson C, Mlotshwa S, et al. Computational prediction of miRNAs in *Arabidopsis thaliana* [J]. Genome Res, 2005, 15: 78-91.
- [8] Sunkar R, Girke T, Jain P K, et al. Cloning and characterization of microRNAs from rice [J]. Plant Cell, 2005, 17: 1397-1411.
- [9] Gustafson A M, Allen E, Givan S, et al. ASRP: the arabidopsis

small RNA project database [J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33: D637-D640.

- [10] Allen E, Xie Z, Gustafson A M, et al. MicroRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants [J]. Cell, 2005, 121: 207-221.
- [11] Axtell M J, Bartel D P. Antiquity of microRNAs and their targets in land plants [J]. Plant Cell, 2005, 17: 1658-1673.
- [12] Hiei Y, Ohta S, Komari T, et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA [J]. Plant J, 1994, 6: 271-282.
- [13] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. Nucleic Acids Res, 1980, 8: 4321-4325.
- [14] Cornejo M J, Luth D, Blankenship K M, et al. Activity of a maize ubiquitin promoter in transgenic rice [J]. Plant Mol Bio, 1993, 23: 558-567.
- [15] Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction [J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(13): 3406-3415.
- [16] Mallory A C, Bartel D P, Bartel B, et al. MicroRNA-directed regulation of *Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17* is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes [J]. Plant Cell, 2005, 17: 1360-1375.
- [17] Wang J W, Wang L J, Mao Y B, et al. Control of root cap formation by microRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2005, 17: 2204-2216.
- [18] Montgomery T A, Howell M D, Cuperus J T, et al. Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation [J]. Cell, 2008, 133(1): 128-141.

(上接第 86 页)

- [21] 钟 蕾, 陈小荣, 汤丽梅. 割茬再生对光温敏核不育水稻“培矮 64S”若干生理活性指标的影响 [J]. 中国生态农业学报, 2006, 14(2): 59-61.
- Zhong L, Chen X R, Tang L M. Effects of stem-cutting ratooning treatment on the activities of some physiological indexes of photoperiod(temperature)-sensitive genic male sterile rice (PTGMSR) “Peiai64S” [J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2006, 14(2): 59-61. (in Chinese)
- [22] 张 丽, 李霄燕, 魏毓棠, 等. 萝卜雄性不育小孢子发育过程中物质代谢的研究 [J]. 安徽农业科学, 2002, 30(3): 326-327.
- Zhang L, Li X Y, Wei Y T, et al. Studies on material metabolism of male sterility in radish [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2002, 30(3): 326-327. (in Chinese)
- [23] 胡美华, 陈竹君, 汪柄良. 榨菜胞质雄性不育系和保持系若干生化特性的比较 [J]. 浙江农业大学学报: 生命科学版, 1998, 24(1): 57-58.
- Hu M H, Chen Z J, Wang B L. Comparison on some biochemi-

cal characters in cytoplasmic male-sterile line and maintainer line for tuber mustard [J]. Journal of Zhejiang University: Agric & Life Sc, 1998, 24(1): 57-58. (in Chinese)

- [24] 董庆华, 利容千, 王建波. 萝卜雄性不育系花药发育组织化学的初步研究 [J]. 武汉植物学研究, 1997, 15(1): 10-14.
- Dong Q H, Li R Q, Wang J B. Histochemistry study on anther development in Male-sterile Radish (*Raphanus sativus* L.) [J]. Journal of Wuhan Botanical Reserch, 1997, 15(1): 10-14. (in Chinese)
- [25] 王 台, 肖翊华, 刘文芳. 光敏感核不育水稻育性诱导和转换过程叶片内碳水化合物含量的变化 [J]. 作物学报, 1991, 17(5): 369-375.
- Wang T, Xiao Y H, Liu W F. Changes in the carbohydrate content in the leaves of HPGMR during the course of induction and transformation of fertility [J]. Acta Agronomica Sinica, 1991, 17(5): 369-375. (in Chinese)