

番茄*SlmiR393*基因超表达载体的构建及其靶基因鉴定

林冬波, 杨迎伍, 李正国*

(重庆大学生命科学学院基因工程研究中心, 重庆 400030)

摘要: 为研究番茄(*Lycopersicon esculentum*)的 *SlmiR393* 基因功能, 采用生物信息学方法从番茄基因组数据库中获得 *SlmiR393* 的前体序列及其潜在的靶基因。以基因组 DNA 为模板, 克隆了番茄 *SlmiR393* 前体基因并整合到 pLP35S-100 植物表达载体; 采用 5' RACE RT-PCR 技术验证 *SlmiR393* 对预测靶基因 mRNA 的剪切作用, 采用定量 PCR 技术检测 *SlmiR393* 及其靶标基因在番茄不同组织的表达。结果表明, *SlmiR393* 的前体序列含有完整的茎环结构; 成熟 miR393 与 3 个生长素受体同源基因 (*SITIR1*、*SITIR1-like1* 和 *SIAFB*) 之间具有识别作用位点。*SlmiR393* 可对番茄 3 个靶基因的转录本进行剪切降解; *SlmiR393* 与 3 个不同靶基因 (*SITIR1*、*SITIR1-like1* 和 *SIAFB*) 的表达模式在叶和茎、花蕾、花中存在一定的互补关系。因此, 推断番茄中的 *SlmiR393* 可能在特定的组织或发育时期介导特定的靶基因 mRNA 的剪切降解, 初步证实生长素受体同源基因为 *SlmiR393* 的靶基因。此外, 成功构建以 CaMV 35S 为启动子的植物表达载体 pLP35S-pre-*SlmiR393*, 为深入研究 *SlmiR393* 在番茄生长素信号转导中的功能奠定了基础。

关键词: 番茄; *SlmiR393*; 生长素受体同源基因; 载体构建

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2013.02.006

Construction of *SlmiR393* Over-expression Vector and Identification of Its Target Genes in Tomato

LIN Dong-bo, YANG Ying-wu, LI Zheng-guo*

(Genetic Engineering Research Center, life science of College, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

Abstract: In order to understand the function of *SlmiR393* in tomato (*Lycopersicon esculentum*), the precursor sequences and potential target genes of *SlmiR393* were obtained by searching tomato genome database with computational algorithms. The *SlmiR393* gene was amplified from tomato genomic DNA by PCR and integrated into plant expression vector pLP35s-100. *Sly-miR393* guided-cleavage to putative target genes mRNAs was validated using 5' RACE RT-PCR. The expression of *SlmiR393* and its target genes in tomato different tissues were determined by Real-time quantitative PCR. The results showed that the precursor sequence of *SlmiR393* contains the complete hairpin structure. Three auxin receptor gene homologs (*SITIR1*, *SITIR1-like1* and *SIAFB*) mRNAs contain recognition sites with high complementarities to *Sly-miR393* sequence. In tomato, *SlmiR393* directs the cleavage of *SITIR1*, *SITIR1-like1* and *SIAFB* mRNA. The expression of *SlmiR393* has opposite effects on *SITIR1*, *SITIR1-like1* and *SIAFB* in stem, leaf, bud and flower, respectively. Therefore, it was suggested that *SlmiR393* might direct specific target gene mRNA cleavage in tomato specific tissue and developmental stage, and the auxin receptor homologous (*SITIR1*, *SITIR1-like1* and *SIAFB*) were validated to be as target of *SlmiR393*. Additionally,

收稿日期: 2012-07-17

接受日期: 2012-10-21

基金项目: 教育部博士点基金项目(20110191110029); 国家自然科学基金项目(30972002, 31071798)资助

作者简介: 林冬波(1986~), 男, 在读博士研究生, 研究方向为植物分子生物学。E-mail: lindongbo05@126.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhengguoli@cqu.edu.cn

the pLP35s-pre-*SlmiR393* vector containing *SlmiR393* gene was successfully constructed with CaMV 35S as promoter, which laid a foundation for further studies of *SlmiR393* function in auxin signaling pathway in tomato.

Key words: Tomato; *SlmiR393*; Auxin receptor gene; Construction

MicroRNA (miRNA)是一类内源性的、长度为21~24个碱基的小分子非编码RNA,它通过对靶基因mRNA的降解或者抑制其翻译等方式,在转录后水平上特异调控靶基因的表达^[1-2]。miRNAs所作用的靶基因大多数是调控植物生长发育的重要转录因子和蛋白。因此,miRNA参与调控植物生长发育的全过程,如根、叶、花等器官的形态建成、细胞分化、信号转导以及逆境胁迫响应等生物学过程^[3-4]。miRNA的相关研究对阐明生物体复杂的生命调控机制具有非常重要的意义,是目前生物学研究的前沿领域和热点之一。

miR393是植物中较保守的miRNA家族。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中,miR393介导调控的靶基因*TIR1*、*AFB1*、*AFB2*、*AFB3*所编码的蛋白属于F-box蛋白^[2],该蛋白在植物生长素信号转导过程中起着重要的调控作用。最近的研究表明,拟南芥miR393的过量表达能够抑制生长素信号转导,明显提高植株对细菌侵染的抗性^[5],并且在根发育中导致侧根数目减少,对生长素敏感性下降^[6]。Xia等的研究表明水稻(*Oryza sativa*)中*OsmiR393*过量表达下调了*TIR1*/*AFB*家族同源基因的表达,导致分蘖多、提前开花、耐盐性和抗旱性降低^[7]。此外,Sunkar等对拟南芥进行冷、干旱、高浓度ABA和高盐等胁迫处理后,miR393的表达水平明显上调,说明miR393与非生物胁迫响应有关^[8]。因此,miR393不仅能够调控生长素信号转导途径,而且能调控对胁迫的响应。

番茄是植物分子生物学研究的重要模式植物之一,但对于番茄miRNA的生物学功能仍知之甚少,尤其是miR393作为重要的转录后调控生长素信号转导途径因子的生物学功能尚未见报道。本研究从番茄中分离与鉴定到*SlmiR393*及靶基因;并构建超表达载体pLP35S-pre-*SlmiR393*,为后期研究*SlmiR393*在番茄生长发育中的生物学功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

野生型番茄(*Lycopersicon esculentum* ‘Micro-

Tom’)种子、大肠杆菌JM109、植物表达载体pLP100为本实验室保存。

DNA提取试剂盒、植物总RNA提取试剂盒、2×PCR Master Mix、FastDigest限制性内切酶、T₄ DNA Ligase、反转录试剂盒购自Fermentas公司;PrimeSTARTM HS DNA Polymerase高保真酶和5'-Full RACE Kit(购自Takara公司);质粒提取试剂盒(E.Z.N.A. Gel Extraction Kit)、凝胶回收试剂盒(E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit I)购自OMEGA公司;pEASY-Blunt克隆载体、DNA Marker plus 2000购自北京全式金生物技术有限公司;其他化学试剂均购于北京索莱宝有限公司;PCR引物合成和测序工作均由北京华大科技公司完成。

1.2 番茄基因组DNA提取

根据DNA提取试剂盒说明书的方法,提取番茄叶片DNA。

1.3 番茄*SlmiR393*前体基因预测及克隆

在数据库miRNA Registry Database (Release 17: April 2011, <http://www.mirbase.org/index.shtml>)下载拟南芥的成熟miR393序列(miRBase登录号:MI0001003),基于小RNA成熟序列的保守性,将其在番茄基因组数据库(<http://solgenomics.net/>)中利用Blast工具且修改Blast的期望阈值(E-value)为1e-0进行比对,寻找番茄*SlmiR393*可能的前体序列。对预测完全与*SlmiR393*成熟序列22 nt匹配的基因组序列进一步筛选,选择*SlmiR393*两端约80 nt的核苷酸序列,采用RNA Structure 4.6软件分析其是否存在典型的发夹二级结构。若能形成完整的颈环结构且成熟序列完全位于5'端,则推测该颈环结构对应的核苷酸序列为潜在的*SlmiR393*前体(pre-*SlmiR393*)。

以番茄基因组DNA为模板,根据*SlmiR393*含有颈环结构的基因组序列,设计特异性引物进行PCR扩增。pre-*SlmiR393*上游引物:5'-CACCTCAGAGTATTTGCGTAAGG-3';下游引物:5'-CATGCTTTTGGTGTGTTGGTGG-3'。PCR反应体系为50 μL:包含10 μL的5×PCR buffer、

4 μL 的 dNTPs (2.5 mmol L^{-1})、1 μL 上游引物 ($10 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$)、1 μL 下游引物 ($10 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$)、1 μL 的 DNA (100 ng)、0.5 μL 的 PrimeSTAR 高保真 DNA Polymerase、32.5 μL 的 ddH₂O。PCR 反应程序为: 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。反应结束后, 分别取 5 μL 的 PCR 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 在紫外凝胶成像系统下观察并拍照, 回收目的条带并纯化, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4 番茄 *SlmiR393* 的靶基因预测

将 *SlmiR393* 序列与 psRNATarget 网站 (<http://bioinfo3.noble.org/psRNATarget/>) 中的番茄 ITAG 2.3cDNA 数据库进行 Blast 比对分析。与成熟 *SlmiR393* 具有高度保守结合的序列初步推测为 *SlmiR393* 的靶基因(最多允许 4 个碱基错配)。

1.5 *SlmiR393* 对靶基因转录本的切割位点鉴定

采用 5' RACE 方法验证小 RNA 对靶标基因 mRNA 的切割作用, 相应的原理如图 1 所示, 如果靶标基因被 miRNA 所识别切割, 则切割产物在逆转录过程中, 其 5' 端也会被加上接头, 利用两对基因特异引物与试剂盒的接头引物组合, 采用巢式 PCR 扩增产物测序; 具体方法如下: Trizol 法提取番茄混合组织的总 RNA, 以 2 μg RNA 为模板, 经过 DNase I 消化之后, 进行 5' RACE RT-PCR 的反

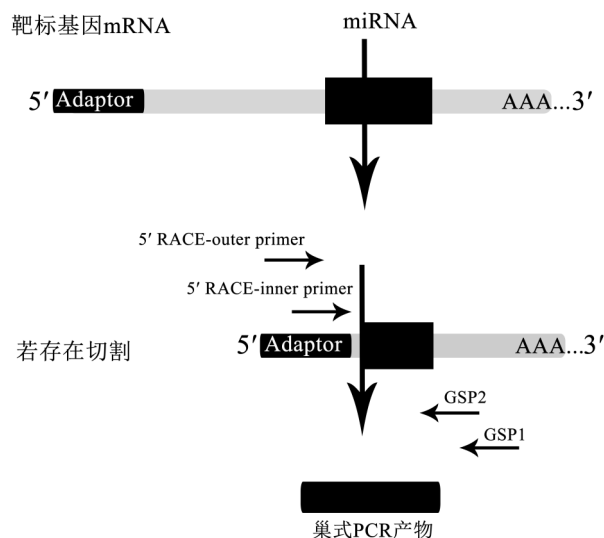


图 1 5' RACE 验证小 RNA 与靶标基因的互作原理

Fig. 1 Validation of interaction between miRNA and target genes by 5' RACE test

转录, 方法参照 5'-Full RACE Kit (TaKaRa) 说明书进行。采用两轮巢式 PCR, 所用引物见表 1, 扩增靶基因的 3' 端剪切片段, 回收扩增产物, 经纯化后克隆到 pEASY-Blunt 载体, 通过测序来分析每个靶基因被切割的位点。

1.6 *SlmiR393* 及其靶标基因的表达分析

参考 Chen 等^[9]的方法, 采用茎环引物 RT-PCR 技术检测 *SlmiR393* 在番茄不同组织(根、茎、叶、花蕾、花、果)中的表达水平。根据 Chen 等^[9]的引物设计原则, 通用茎环引物 3' 端上 7 个碱基与成熟 miR393 序列 3' 端互补配对, 反转录和定量 PCR 反应所用引物见表 1。

番茄总 RNA 的提取样品, 经 DNase I (Fermentas) 处理去除残留的基因组 DNA, 参考提取试剂盒说明方法合成第一条反转录反应 cDNA 链。为了更好地检测剪切后靶基因的表达量, 我们设计的上下游定量引物跨越每个靶基因与 *SlmiR393* 结合的位点。定量 PCR 检测参考 Yang 等^[10]的方法。

1.7 植物表达载体的构建

目的基因的克隆 将所回收的 PCR 产物, 与经过 *Sma*I 酶切的植物表达载体 pLP100-35S 进行连接, 其反应体系为: 10 \times T₄ DNA ligation Buffer 1 μL , PEG-4000 1 μL , T₄ DNA ligase 1 μL ($5 \text{ U }\mu\text{L}^{-1}$), pre-*SlmiR393* 目的片段 7 μL , pLP100-35S 载体片段 1 μL ($50 \text{ ng }\mu\text{L}^{-1}$), 总体积为 10 μL , 混匀后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜。将连接产物转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109 感受态细胞, 随机挑取 10 个单菌落进行 PCR 鉴定。

阳性转化子的鉴定 为了快速检测到 pre-*SlmiR393* 目的片段正向插入载体的阳性克隆子, 我们根据 pLP100-35S 载体多克隆位点上游的 35S 启动子序列区域, 设计 1 个特异性前引物(pLP35S-cx), 以 pre-*SlmiR393* 目的片段为后引物, 以单菌落为模板进行 PCR 检测, 并初步鉴定阳性克隆子。上游引物(pLP35S-cx): 5'-CCCCGAAAAGTGCCACCTGACGT-3'; 下游引物(pre-*SlmiR393*-R): 5'-CGA-ATCGAACTCCTTACGCAA-3'。PCR 扩增反应体系总体积 20 μL : 包含 2 \times PCR Master Mix 10 μL 、上游引物 ($10 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$) 1 μL 、下游引物 ($10 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$) 1 μL 、ddH₂O 8 μL , 以菌体细胞为模板。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 退

表 1 5' RACE PCR 和定量 PCR 所用的引物

Table 1 Primers used for 5' RACE PCR and RT-PCR

引物 Primer	序列 Sequence
5' RACE Outer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA
TIR1-GSPI	GTTGCAGTGCCAGTTGAGGGTTGGAA
TIR1-like1-GSPI	GCGTGGAGTGGATAGATGATATGC
AFB-GSPI	ACCTGCATTACTTGCTTGA
5' RACE Inner	CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG
TIR1-GSPII	GCAAGACTTCACATGAAAGATGGGCAG
TIR1-like1-GSPII	TTACTCTCCCTCTGTCTATGCTCG
AFB-GSPII	GGG AITTTCTTTTGGCTTCTTCT
Stem-loop RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACTGGATACGACGGATCAA
UP-R	CCAGTGCAGGGTCCGAGGTA
<i>SlmiR393</i> -F	GCGCGGTCCAAAGGGATCGCA
U6-F	TCTAACAGTGTAGTTTGTCCCTTCG
U6-R	TTGTGCGTGTCACTCTTGC
SITIR1-F	GGCTCTCTGGCTAATGCTGC
SITIR1-R	GGCCTTGATCTGGAGGACCCC
SITIR1-like1-F	TGAGATGAAATGAATCCGAGC
SITIR1-like1-R	CATATCATCTATCCACTCCACGCTA
SlAFB-F	GGCTCTGTTGGCTATTGCTGCAAAG
SlAFB-R	CATTGCTATATGGAGTCGATGTTGC
SlActin-F	TGTCCCTATTTACGAGGGTTATGC
SlActin-R	CAGTTAAATCACGACCAGCAAGAT

火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环;最后 72 °C 延伸 5 min。反应结束后,分别取 5 μ L PCR 反应液在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳。然后将初步验证为含有阳性转化子的单菌落,接种于含有 Kan (100 mg L⁻¹) 的 LB 液体培养基中,于 37 °C 恒温以 250 r min⁻¹ 振荡培养过夜。提取阳性转化子质粒送北京华大基因科技公司进行测序验证。

2 结果和分析

2.1 番茄 *SlmiR393* 的前体序列预测

通过生物信息学方法,在番茄基因组数据库 (<http://solgenomics.net/index.pl>) 中进行 Blast 序列比对,搜索到两个基因组序列 SL2.40sc04696 和 SL2.40sc039022 分别与成熟 miR393 序列完全匹配;对预测的成熟 miR393 所对应基因组的两翼序列进行二级结构分析表明,只有 SL2.40sc04696 基因组上两端的 80 nt 序列能够形成完整的颈环结构

且符合植物 miRNA 前体的特征。图 2: A 中 5' 端粗体字标明的序列 (UCCAAAGGGGAUCGCAUUG-AUCC) 为成熟 miR393 序列。因此,我们推测该颈环结构对应的核苷酸序列为潜在 *SlmiR393* 前体 (*pre-SlmiR393*)。

以番茄基因组 DNA 为模板,根据颈环结构的两端序列分别设计特异性 *pre-SlmiR393* 的前、后引物,进行 PCR 扩增,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳确认目的片段。电泳结果可见,目的条带单一, DNA 片段大小与预期的一致,为 334 bp (图 2: B)。

2.2 靶基因编码的蛋白

植物 miRNA 与靶基因 mRNA 序列之间的高度互补性,有助于进行 miRNA 靶基因的生物信息学预测^[11]。将 *SlmiR393* 序列与 psRNATarget 网站 (<http://bioinfo3.noble.org/psRNATarget/>) 中的番茄 ITAG2.3cDNA 数据库进行比对分析,结果表明, *Solyc09g074520*、*Solyc02g079190* 和 *Solyc06g008780*

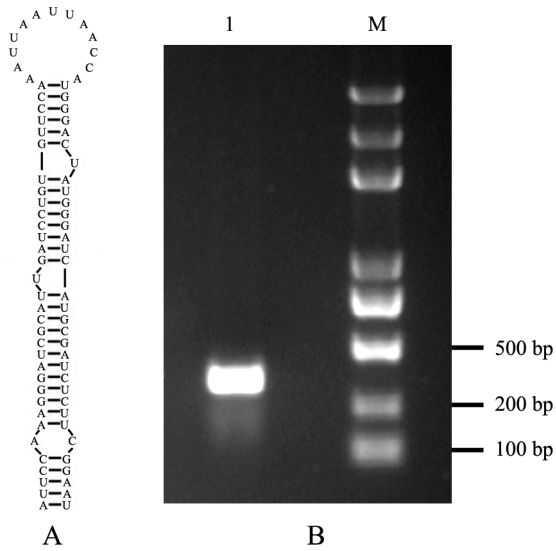


图2 番茄*SlmiR393*基因发夹结构及克隆。A. *SlmiR393*的发夹结构；B. *SlmiR393*前体基因的PCR产物；1:*SlmiR393*目的片段；M: Trans 2000 DNA Marker。

Fig. 2 Hairpin structure and clone of tomato *SlmiR393*. A. Hairpin structure of *SlmiR393*; B. PCR products of *SlmiR393*; 1. *SlmiR393*; M: Trans 2000 DNA Marker.

基因序列与成熟*SlmiR393*序列相互结合位点有3~4个碱基错配,且他们编码的蛋白在功能上属于生长素F-box蛋白。在前期研究中,我们已经从番茄中分离到生长素受体*TIR1/AFBs*家族基因中的同源基因*SITIR1* (GenBank 登录号:GQ370812)^[12]。对所预测到的3个靶标基因氨基酸序列进行对比,结果表明*Solyc09g074520*即是*SITIR1*,

*Solyc02g079190*与番茄中的*SITIR1*同源相似性达55%,*Solyc06g008780*则与拟南芥的*AFB*基因家族的同源相似性为60%。因此,将番茄中*SlmiR393*的3个潜在靶基因分别命名为:*SITIR1*、*SITIR1-like1*和*SIAFB*。

2.3 *SlmiR393*对靶基因的剪切鉴定

miRNA是通过剪切降解的方式对靶基因的表达进行负调控,为了进一步验证番茄体内的*SlmiR393*对潜在的靶基因转录本是否存在有剪切作用,采用改良的5' RACE方法对3个靶基因mRNA的3'端剪切产物进行扩增(图3:A),3个不同目的片段经过琼脂糖凝胶电泳分离,分别切胶回收,克隆到中间载体上,并随机挑选8个阳性克隆子进行测序鉴定。测序结果显示,*SlmiR393*对靶标*SITIR1*、*SITIR1-like1*和*SIAFB*均存在剪切作用;对每个靶基因被*SlmiR393*剪切的作用位点进行分析表明,*SITIR1*和*SIAFB*均在CGA/UCC位点被剪切,*SITIR1-like1*却在CGG/UGU位点被剪切,但是这些剪切位点都是位于成熟miR393结合序列的第10和11个碱基之间(图3:B)。这也表明在番茄中3个生长素受体同源基因*SITIR1*、*SITIR1-like1*和*SIAFB*均为*SlmiR393*的靶基因。

2.4 *SlmiR393*及其靶基因的表达

分析miRNA的组织 and 发育特异性表达,可为研究miRNA在生长发育过程中的潜在生理生化功

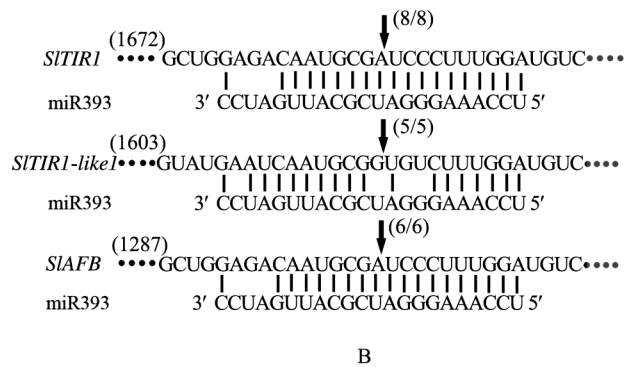
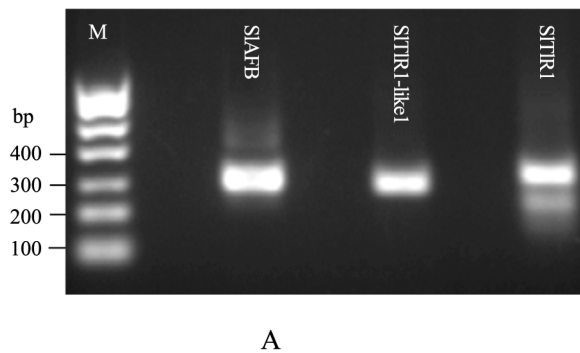


图3 *SlmiR393*对靶基因mRNA剪切作用的验证。A. 5'RACE RT-PCR分离靶基因3'端剪切产物,*SITIR1*、*SITIR1-like1*和*SIAFB*为第二轮巢式PCR的扩增产物;M: DNA marker I; B. *SITIR1*、*SITIR1-like1*和*SIAFB*转录本的剪切位点(箭头),分数为每个切割位点由5'-RACE实验验证的频率。

Fig. 3 Validation of *Sly-miR393* guided cleavage of target gene mRNA. A. Amplification of 3' cleavage-sequences of target gene; The electrophoretogram shows the nested PCR products representing the 3'-cleavage fragments that were cloned and sequenced for each gene; M: DNA marker I; B. Mapping of cleavage sites of *SITIR1*, *SITIR1-like1* and *SIAFB*; Cleavage sites in the target recognition sequences are marked with arrowheads, and their frequency among sequenced clones of the same approximate size is noted above.

能提供重要的依据。本研究采用茎环引物 RT-PCR 方法分析 *SlmiR393* 在番茄不同组织中的表达模式。结果表明, *SlmiR393* 在不同组织均有表达, 但表达水平不同, 其中茎的表达最高, 花的较强, 根、叶、花蕾的表达水平中等, 果实的较弱(图 4: A)。为了更进一步探讨 *SlmiR393* 与靶基因之间的表达水平是否存在互补的关系, 通过定量 PCR 技术对靶基因在番茄中的组织特性表达模式进行分析, 结果表明, *SITIR1*、*SITIR1-like1* 和 *SIAFB* 基因存在不同的组织时空表达模式, *SITIR1* 在叶和花中的表达水平高, 超表达 *SITIR1* 导致了叶形态结构发生改变及出现单性结实的表型, 这与 Ren 等^[12]的报道结果一致。*SITIR1-like1* 在花中的表达强烈, 在根、茎、叶、花蕾中的表达次之, 果实中仅有微弱表达。*SIAFB* 在茎中的表达较高, 其他组织中的表达水平略低

(图 4: B, C, D)。这些结果表明, *SlmiR393* 积累水平与靶基因的表达量在所有组织中并不完全成负相关, 其中 *SITIR1* 在叶和茎中、*SITIR1-like1* 在花蕾、*SIAFB* 在花和叶中出现互补的关系。

2.5 *SlmiR393* 植物表达载体的构建及鉴定

将目的片段切胶回收, 正向克隆到 pLP35S 超表达载体, 命名为 pLP35S-pre-*SlmiR393* (图 5)。以 pLP35S-cx 和 Pre-*SlmiR393*-R 为引物, 对菌落进行 PCR 鉴定。从图 6 可见, 1 号和 4 号单菌落能扩增出 835 bp 的目的条带, 与预期结果相符, 说明目的片段已成功正向插入植物表达载体 pLP100-35S, 即获得重组质粒 pLP35S-pre-*SlmiR393*。将初步验证正确的重组质粒进行测序, 结果表明获得的序列完全正确。

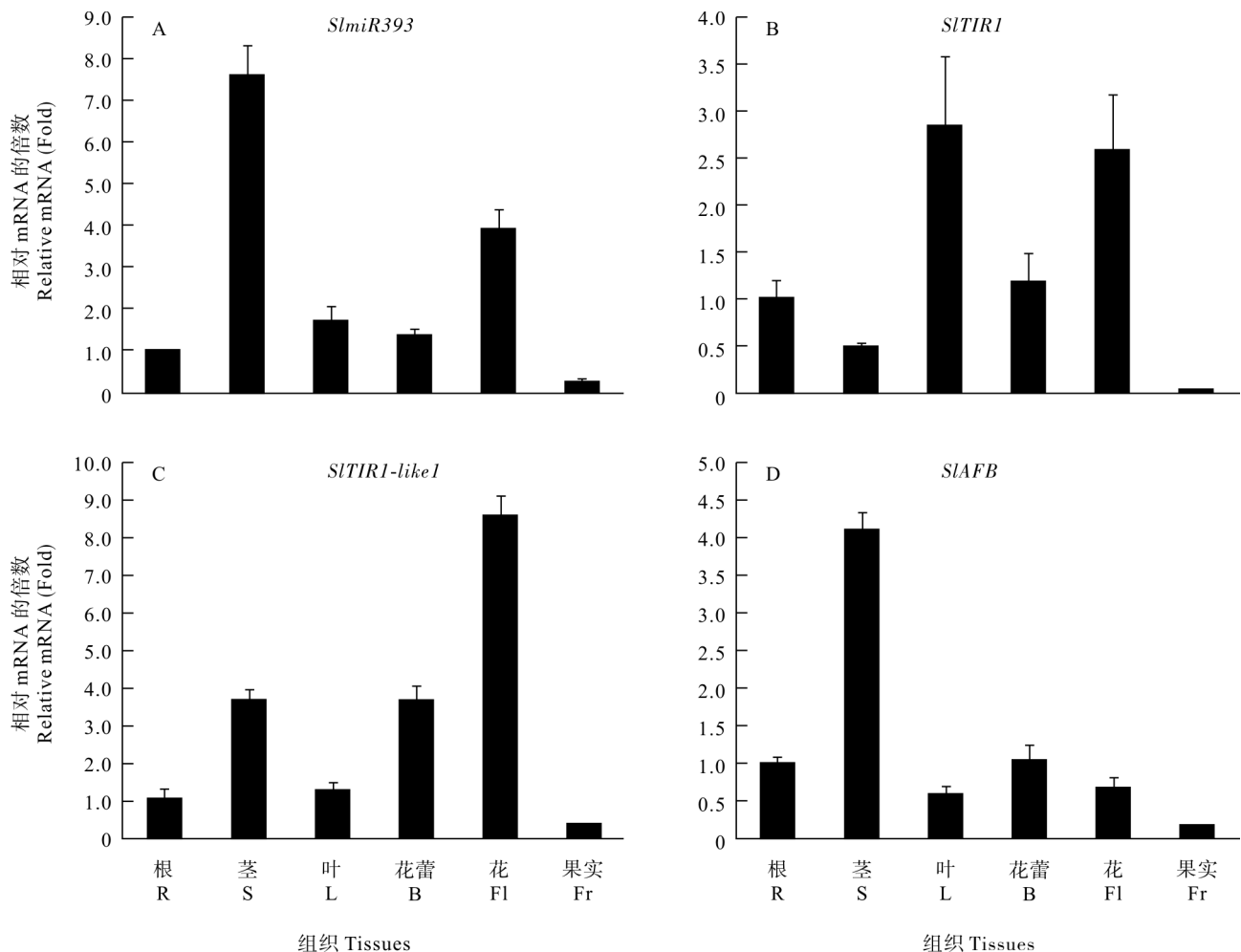


图 4 *SlmiR393* 及其靶基因在番茄不同组织中的表达模式。

Fig. 4 Expression pattern of *SlmiR393* and targets in different tissues of tomato. R. Root; S. Stem; L. leaf; B. Bud; Fl. Flower; Fr. Red fruit.

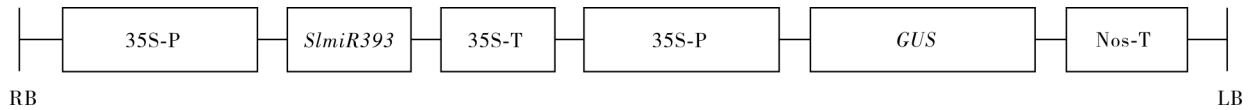


图5 *SlmiR393* 基因植物表达载体的构建图。miR393: *SlmiR393* 前体基因; *GUS*: *GUS* 基因; 35S-P: CaMV 35S 启动子; 35S-T: CaMV 35S 终止子; NOS-T: NOS 终止子。

Fig.5 Construction of *SlmiR393* plant expression vector. miR393: Precursor sequences of *SlmiR393*; *GUS*: *GUS* gene; 35S-P: CaMV 35S promoter; 35S-T: CaMV 35S terminator; NOS-T: NOS terminator.

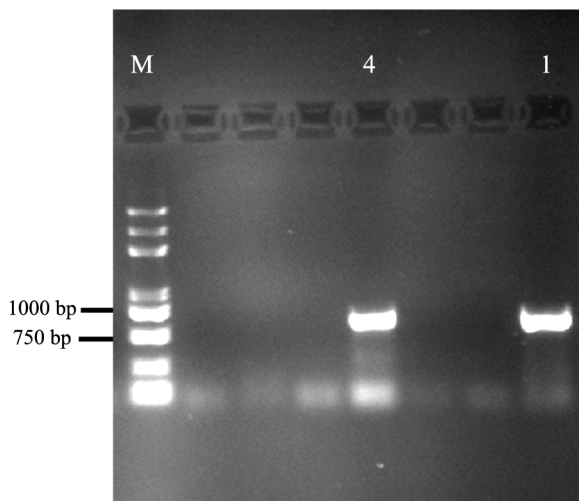


图6 重组子菌落 PCR 鉴定。1,4: 阳性克隆; M: Trans 2000 DNA Marker。

Fig. 6 Verification of positive clones by PCR. 1,4: Positive clones; M: Trans 2000 DNA Marker.

3 讨论

目前,植物中已发现和分离了许多 miRNA^[13]。基于 miRNAs 序列的保守性和特殊结构,生物信息学方法已成为一种最直接、快速、简便的鉴定 miRNAs 的方法。随着番茄基因组数据库的完善,有助于采用生物信息学方法对番茄 miRNAs 进行初步预测和鉴定。尽管生物信息学方法能够快速预测到保守的 miRNAs,但仍存在一定的局限性,如预测错误、信息不全等现象。因此,对预测到的 miRNAs 进行实验验证是很有必要的。

不同植物的 miR393 具有高度保守性,可以更好地寻找到物种间靶标的同源基因。通过生物信息学预测和 5' RACE 技术相结合,在拟南芥和水稻中鉴定出 miR393 的靶标基因是生长素的受体 *TIR1 / AFB* 基因家族^[5,7]。在已知的番茄基因组序列中,通过序列比对,我们认为 *SlmiR393* 靶基因也

是编码生长素受体 F-box 蛋白家族的成员。本研究采用 5' RACE 技术证实,番茄 *SlmiR393* 介导靶基因 (*SITIR1*、*SITIR1-like1* 和 *SlAFB*) 的 mRNA 剪切降解,并且剪切位点符合大多数植物 miRNAs 对靶基因的剪切常常发生在结合序列中间位置的一般性规律^[2]。这些结果表明不同植物中 miR393 对目标基因的识别位点是保守的,由此我们推测 miR393 功能在不同植物也具有一定的相似性。

miRNAs 对靶基因具有剪切作用,使不同靶基因之间的表达水平表现出相斥的特点。因此,大多数植物 miRNAs 的表达模式与靶基因的表达模式是相反的。在拟南芥中,miR398 与其靶基因 *CSD1* 和 *CSD2* 在不同组织、发育阶段的表达模式都表现出相反关系^[14]。此外,玉米 (*Zea mays*) 中 miR166 和靶基因 *leaf1* 之间也存在相斥表达的现象^[15]。但拟南芥的成熟 miR393 与靶基因的表达模式不存在典型的互补关系^[16]。本研究中,番茄 *SlmiR393* 并没有像其他物种中的 miRNA 与其靶基因表达水平呈现出相反的现象。只是在番茄某个特定组织、发育时间出现这样相斥表达的现象。由此我们推断 *SlmiR393* 可能在特定的组织或时期内介导特定的靶基因 mRNA 的剪切降解,而不是下调所有的靶基因表达。尽管如此,靶基因作为番茄生长素信号途径中重要的组分,也可能在转录水平上受到其它因素的影响。

由于很多植物 miRNA 都具有多个基因座位,运用正向遗传筛选法很难找到完全功能缺失的 miRNA 突变体。尽管拟南芥中发生了 T-DNA 插入突变 miR164b (*miR164b-1*),但表型并没有很明显的缺陷,因为成熟的 miR164 至少是由 3 个基因座位所编码形成的^[17]。因而,阐明植物的 miRNAs 功能都是通过超表达编码 miRNA 的前体序列,或对靶基因 mRNA 上的剪切位点进行突变等方法来实现的^[18]。在转基因植物体内超表达 miRNA 前体基因,使得内源的成熟 miRNA 积累水平增强,反而

降低了靶基因的 mRNA 的表达丰度。这样的转基因植株中就出现类似靶基因功能丧失的突变表现。目前,使用这种方法研究番茄中 miRNA 的具体功能也有一些报道。超表达 *SlmiR156* 的转基因植株表现出腋芽增多、叶片变小、植物矮化等特征^[19]; 番茄中超表达 *SlmiR169* 具有提高抗干旱胁迫的能力^[20]。另外,番茄中通过分别超表达 *SlmiR4376* 和定点突变靶基因 *ACA10* mRNA 上的剪切位点,番茄的花形态特征发生变化,且果实产量降低^[21]。这些结果表明,植物 miRNA 超表达能够揭示它们具体的功能。因此,本研究构建了 *SlmiR393* 植物超表达载体 pLP35s-pre-*SlmiR393*,并通过农杆菌介导的叶盘法转化番茄,旨在得到超表达的转基因植株,这对于了解 *SlmiR393* 基因在番茄生长素信号转导中的作用具有重要的意义。

参考文献

- [1] Bartel D P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281–297.
- [2] Jones-Rhoades M W, Bartel D P. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA [J]. *Mol Cell*, 2004, 14(6): 787–799.
- [3] Kidner C A, Martienssen R A. The developmental role of microRNA in plants [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8(1): 38–44.
- [4] Zhang B H, Pan X P, Cobb G P, et al. Plant microRNA: A small regulatory molecule with big impact [J]. *Dev Biol*, 2006, 289(1): 3–16.
- [5] Navarro L, Dunoyer P, Jay F, et al. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling [J]. *Science*, 2006, 312(5772): 436–439.
- [6] Parry G, Calderon-Villalobos L I, Prigge M, et al. Complex regulation of the TIR1 / AFB family of auxin receptors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(52): 22540–22545.
- [7] Xia K F, Wang R, Ou X J, et al. *OsTIR1* and *OsAFB2* down-regulation via *osmiR393* overexpression leads to more tillers, early flowering and less tolerance to salt and drought in rice [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(1): e30039.
- [8] Sunkar R, Zhu J K. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2004, 16(8): 2001–2019.
- [9] Chen C F, Ridzon D A, Broomer A J, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR [J]. *Nucl Acids Res*, 2005, 33(20): e179.
- [10] Yang Y W, Wu Y, Pirrello J, et al. Silencing *Sl-EBF1* and *Sl-EBF2* expression causes constitutive ethylene response phenotype, accelerated plant senescence and fruit ripening in tomato [J]. *J Exp Bot*, 2010, 61(3): 697–708.
- [11] Chen X M. MicroRNA biogenesis and function in plants [J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(26): 5923–5931.
- [12] Ren Z, Li Z, Miao Q, et al. The auxin receptor homologue in *Solanum lycopersicum* stimulates tomato fruit set and leaf morphogenesis [J]. *J Exp Bot*, 2011, 62(8): 2815–2826.
- [13] Zhang L F, Chia J M, Kumari S, et al. A genome-wide characterization of microRNA genes in maize [J]. *PLoS Genet*, 2009, 5(11): e1000716.
- [14] Sunkar R, Kapoor A, Zhu J K. Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance [J]. *Plant Cell*, 18(106): 2051–2065.
- [15] Juarez M T, Kui J S, Thomas J, et al. MicroRNA-mediated repression of rolled *leaf1* specifies maize leaf polarity [J]. *Nature*, 2004, 428(6978): 84–88.
- [16] Chen Z H, Bao M L, Sun Y Z, et al. Regulation of auxin response by miR393-targeted transport inhibitor response protein 1 is involved in normal development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Mol Biol*, 2011, 77(6): 619–629.
- [17] Reinhart B J, Weinstein E G, Rhoades M W, et al. MicroRNAs in plants [J]. *Genes Dev*, 2002, 16(13): 1616–1626.
- [18] Dugas D V, Bartel B. MicroRNA regulation of gene expression in plants [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2004, 7(5): 512–520.
- [19] Zhang X H, Zou Z, Gong P J, et al. Over-expression of microRNA169 confers enhanced drought tolerance to tomato [J]. *Biotech Lett*, 2011, 33(2): 403–409.
- [20] Zhang X H, Zou Z, Zhang J H, et al. Over-expression of *sly-miR156a* in tomato results in multiple vegetative and reproductive trait alterations and partial phenocopy of the *sft* mutant [J]. *FEBS Lett*, 2011, 585(2): 435–439.
- [21] Wang Y, Itaya A, Zhong X, et al. Function and evolution of a microRNA that regulates a Ca^{2+} -ATPase and triggers the formation of phased small interfering RNAs in tomato reproductive growth [J]. *Plant Cell*, 2011, 23(9): 3185–3203.