

• 药材与资源 •

黄芪 miRNA 的预测及其干旱表达模式分析

韦春香, 肖自华, 黄曦, 李华云, 高飞*, 周宜君

中央民族大学生命与环境科学学院, 北京 100081

摘要: 目的 利用生物信息学手段预测黄芪 *Astragalus membranaceus* 的 miRNA 及其靶基因, 应用定量 PCR 分析其干旱胁迫表达模式, 为黄芪 miRNA 研究奠定基础。方法 下载公共核酸数据库中的黄芪高通量测序序列, 使用 Trinity 软件拼接获得转录本数据。利用生物信息学预测方法进行黄芪 miRNA 及其靶基因的预测, 并对靶基因进行功能分类分析。利用茎环引物荧光定量 PCR 方法验证 miRNA 的存在, 并分析 miRNA 在干旱胁迫下的表达模式。结果 序列拼接获得 88 263 条黄芪转录组数据。使用这些数据预测到分属于 17 个家族的 17 个 miRNA 序列以及相应的茎环结构前体。这些 miRNA 靶向的 145 个基因主要参与基因转录调控、物质代谢、信号转导、胁迫应答和蛋白翻译后修饰等生物学过程。随机选取 8 个 miRNA 进行茎环引物荧光定量 PCR 验证, 其干旱逆境表达模式分析表明 miR2118 和 miR166 可能参与了黄芪的干旱胁迫应答。结论 预测的黄芪 miRNA、靶基因以及干旱应答 miRNA, 为理解 miRNA 在黄芪中的生物学功能提供了重要数据。

关键词: 黄芪; miRNA; 生物信息学; 定量 PCR; 干旱胁迫

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)01-0155-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.01.022

Prediction of microRNAs and drought expression pattern analysis in *Astragalus membranaceus*

WEI Chun-xiang, XIAO Zi-hua, HUANG Xi, LI Hua-yun, GAO Fei, ZHOU Yi-jun

College of Life and Environmental Sciences, Minzu University of China, Beijing 100081, China

Abstract: Objective To provide a good start for the study of miRNA in *Astragalus membranaceus*, the miRNAs and their targets were predicted using bioinformatics approach, then the drought-induced expression pattern was analyzed using quantitative RT-PCR. **Methods** The deep sequencing data downloaded from public database were assembled using Trinity to establish the transcriptome database. Bioinformatics method was employed to predict miRNAs and their targets, functional classification analyses of targets were conducted. Stem-loop fluorescence quantitative PCR method was used to validate miRNAs, and the drought-induced expression patterns of miRNA were also determined. **Results** A transcriptome database with 88 263 sequences was obtained. Based on the transcriptomic sequences, 17 miRNA, classified into 17 families, generated from 17 stem-loop precursors, were identified. A total of 145 genes were predicted to be regulated by these miRNAs, and these genes were involved into diversified biological processes including gene transcription regulation, substance metabolism, signal transduction, stress response, and post translational modification of protein. Eight miRNAs were randomly selected for expression analysis and the results indicated that miR2118 and miR166 might be involved in drought stress response. **Conclusion** The miRNAs, the corresponding targets and the drought response miRNAs identified in this study will provide a solid basis for understanding the biological functions of miRNAs in *A. membranaceus*.

Key words: *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge; miRNA; bioinformatics; RT-PCR; drought stress

黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge 是豆科 (Leguminosae) 黄芪属 *Astragalus* Linn. 多年生草本药用植物^[1]。黄芪是我国 40 种常用大宗药材品种之一, 广泛用于中成药之中, 是一种重要的

主原料药材之一, 药用量大且历史悠久。黄芪经典名方包括玉屏风散、补中益气汤、黄芪建中汤和归脾汤等^[2]。《神农本草经》提出黄芪具有补气升阳、固表止汗、利水消肿、生津养血等功效。现代临

收稿日期: 2016-08-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31370356, 31670335); 中央民族大学学术团队建设项目 (2015C8); 北京市大学生科学研究与创业行动计划 (BEIJ2016110019)

作者简介: 韦春香 (1992—), 女, 硕士在读, 研究方向为生物化学与分子生物学研究。Tel: (010)68932633 E-mail: wchx0988@muc.edu.cn

*通信作者 高飞, 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事生物化学与分子生物学研究。Tel: (010)68932633 E-mail: gaofei@muc.edu.cn

床黄芪常用于治疗心气虚损、血脉瘀阻之病毒性心肌炎、心功能不全及脾虚湿困之肝炎等疾病^[1]。近年来,人们对保健需求的进一步增加导致黄芪需求量剧增,我国各地出现了多个黄芪栽培品种,黄芪药材品质参差不齐,研究黄芪药用活性成分的形成和调控机制,加强种质资源鉴定、保存和良种选育尤为必要。

MicroRNA (miRNA) 是动植物中广泛分布的一类非编码内源性单链小分子 RNA, 长度在 19~25 个核苷酸, 被美国《科学》杂志列为 2002 年世界十大科技突破之首^[3]。最早发现的 miRNA 是秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 的 *lin-4* 和 *let-7*^[4-5]。植物 miRNA 最早在拟南芥中被发现^[6]。到目前为止, 已有 206 个物种的 24 521 种 miRNA 被发现^[7]。miRNA 主要在转录后水平通过与靶基因的碱基互补配对, 进而介导靶基因的降解或翻译抑制来调控基因表达。在植物中, miRNA 通过负调控 SPL (SQUAMOSA promoter-binding protein-like)、TCP 和 MYB 等转录因子和其他重要的功能基因, 广泛参与植物生长发育、形态建成、逆境胁迫应答和次生代谢调控等多种生物学过程, 发挥重要的作用^[8]。

已进行的植物 miRNA 研究主要针对拟南芥、水稻等模式植物和作物进行。近年来, 对药用植物 miRNA 的研究受到越来越多的重视, 研究人员利用高通量测序、miRNA 芯片、生物信息学分析等方法研究了人参、红豆杉、半夏、千里光和毛地黄等中药的 miRNA, 从这些药用植物中鉴定出一些 miRNA, 对部分 miRNA 在次生代谢中的调控作用进行分析, 取得了初步进展^[9-10]。黄芪作为中国传统的大宗药材, 在我国中医药中占重要的地位。迄今为止, 研究者们对于黄芪的化学成分、药理作用、炮制和贮藏养护方法方面进行了大量研究, 并取得了较大进展^[11]; 但是对于黄芪的药用活性成分的形成、调控的分子机制还不清楚, 对于与这些调控机制相关的重要遗传因子——miRNA 的相关研究也未见报道。本实验拟应用生物信息技术与实验方法, 鉴定黄芪的 miRNA, 并分析干旱胁迫对黄芪 miRNA 表达的影响, 为进一步研究黄芪 miRNA 的生物学功能, 特别是在次生代谢途径调控中的作用奠定基础。

1 材料

黄芪种子来自内蒙古自治区鄂尔多斯市, 其植株经中央民族大学生命与环境科学学院刘博博士鉴

定为黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge。

Trizol 试剂购自美国英杰生命技术有限公司 (Invitrogen), 逆转录试剂和荧光定量 PCR 试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司, 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 胁迫处理

播种前先将黄芪种子于 50 °C 温水中浸泡 12~24 h, 然后放在湿毛巾中催芽, 待露白后播种。土壤由蛭石和营养土混合而成 (体积比 3:1)。黄芪生长 8 周后用 20% PEG6000 进行干旱处理 3 d, 取对照组和干旱处理组的根与叶用液氮速冻后于 -80 °C 保存备用。

2.2 黄芪核酸数据的获取和转录本数据拼接

在 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 下载黄芪的高通量测序数据。数据登录号为 ERR706814 和 SRR923811。数据滤过使用软件 Trimmomatic (<http://www.usadellab.org/cms/index.php?page=trimmomatic>)^[12] 和 SolexaQA (<http://solexaqa.sourceforge.net/>)^[13]。拼接使用 Trinity (<http://trinityrnaseq.github.io/>)^[14], 拼接使用默认参数进行。

2.3 黄芪 miRNA 及其靶基因的预测和注释

miRNA 的具体预测流程按照文献方法^[15]进行。使用 psRNAtarget 软件进行靶基因的预测^[16], 预测使用默认参数, 即最大期望值 (maximum expectation) 为 3.0, 互补打分序列长度 (length for complementarity scoring) 为 20 bp, 靶基因的最大数量 (top target genes for each small RNA) 为 200, 靶基因可及性 (target accessibility) 为 25。通过将靶基因序列比对到拟南芥蛋白序列来注释靶基因, 截取标准为 E 值 $< 1 \times 10^{-5}$ 。

2.4 茎环引物实时荧光定量 PCR

用 Trizol 试剂提取植物组织总 RNA, 具体方法参照说明书。分别提取对照组和干旱组的黄芪幼苗根、叶的总 RNA, 使用 NanoDropTM2000 分光光度计 (Thermo Fisher, USA) 检测总 RNA 的浓度和纯度, 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性。

miRNA 的表达检测采用茎环引物实时荧光定量 PCR 法。随机选取 8 个 miRNA, 分别设计逆转录茎环引物及荧光定量 PCR 引物 (表 1)。使用逆转录引物进行第一链反转录, 然后用荧光定量 PCR 检测 miRNA 的表达情况。荧光定量 PCR 反应在

表 1 用于实验验证的 miRNA 及其引物

Table 1 miRNAs used for experimental validation and their primers

miRNA	miRNA 序列 (5'-3')	逆转录引物 (5'-3')	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')
ame-miR1 56b-3p	UGCUCACUCUCUA- UCUGUCACC	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTC- GCACCAGAGCCAACGGTGAC	GGGTGCTCACT- CTCTATCT	GTGCAGGGTCCGA- GGT
ame-miR1 59e-3p	AGCUGCUAAGCUA- UGGAUCCC	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTC- GCACCAGAGCCAACGGGATC	GTGGAGCTGCT- AAGCTATG	GTGCAGGGTCCGA- GGT
ame-miR1 68a-3p	CCCGCCUUGCAUC- AACUGAAU	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTC- GCACCAGAGCCAACATTCAG	GTTCCCCGCCTT- GCATCAA	GTGCAGGGTCCGA- GGT
ame-miR2 118-3p	UUACCGAUUCCAC- CCAUGCCU	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTC- GCACCAGAGCCAACAGGCAT	GTTGTTACCGAT- TCCACCC	GTGCAGGGTCCGA- GGT
ame-miR3 630-3p	UUGGGAAUCUCUC- UGAUGCA	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTC- GCACCAGAGCCAACACTGCATC	GTGGGTTGGGA- ATCTCTCT	GTGCAGGGTCCGA- GGT
ame-miR1 56a-5p	UUGACAGAAGAU- GAGAGCAC	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTC- GCACCAGAGCCAACGGAGGT	GTTGGTTGGCAT- TCTGTCC	GTGCAGGGTCCGA- GGT
ame-miR1 66l-3p	UCGGACCAGGCUU- CAUUC CCC	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCG- CACTGGATACGACGGGGAA	CGGTCGGACCA- GGCTTCATT	CCAGTGCAGGGTC- CGAGGTATTC
ame-miR1 67a-5p	UGAAGCUGCCAGC- AUGAUCUGA	GCGTGGTCCACACCACCTGAGCCGCCACGA- CCACGCTCAGATCA	GAGCCGTGAAG- CTGCCAG	TCCACACCACCTG- AGCCG

MiyQ2 型荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad) 上运行, 按照 FastFire 快速荧光定量 PCR 预混试剂 (TIANGEN, CHINA) 说明书步骤在冰上配制反应体系: 2×FastFire qPCR PreMix 10 μL, PCR 正向引物 (10 μmol/L) 0.6 μL, PCR 反向引物 (10 μmol/L) 0.6 μL, cDNA 2.0 μL, ddH₂O (灭菌蒸馏水) 补足至 20 μL, 设置温度梯度摸索 PCR 最佳退火温度, 最终确定反应条件为 95 °C 预变性 1 min, 95 °C 变性 5 s, 56 °C 退火延伸 15 s, 40 个循环, 延伸阶段收集信号, 从 56 °C 到 95 °C, 每个循环增加 0.5 °C, 持续 0.05 s 获得解链温度, 采集溶解曲线荧光信号。反应结束后确认实时荧光定量 PCR 的扩增曲线和熔解曲线, 记录 C_t 值。最后利用 3.5% 琼脂糖凝胶电泳对茎环引物实时荧光定量 PCR 产物进行验证。定量 PCR 反应以 U6 作为内参, 其正向引物序列为 5'-GAGTTGAGCAACATGGAAACC-3', 反向引物序列为 5'-TGGATTGTGCAGCTTCTTTT-3'。每个反应设置 3 个平行, 每个实验组设置 3 个生物学重复。采用 2^{-ΔΔC_t} 法来计算干旱处理前后 miRNA 的相对表达量^[17]。

3 结果与分析

3.1 黄芪转录本数据的拼接

首先用 Trimmomatic 软件下载的黄芪高通量数

据进行滤过, 获得去除测序接头、去除低质量数据、去除冗余序列的可用于拼接的数据。然后用 Trinity 拼接。拼接结果的主要参数见表 2。

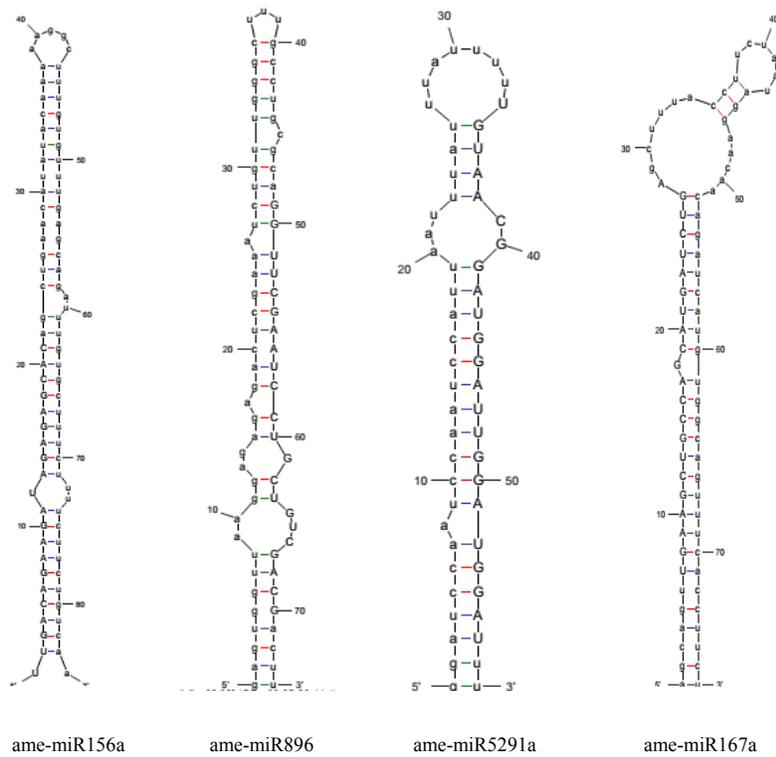
3.2 预测到的黄芪 miRNA、前体及其二级结构

以已知植物 miRNA 前体序列为探针与拼接获得的 86 647 条黄芪转录本序列进行 BLASTN 比对分析, 筛选出 546 条转录本序列。去除其中的蛋白编码基因后, 得到 109 条潜在的 miRNA 前体序列, 进一步对这些转录本进行手动筛选, 确定了其中能够用 Mfold 软件折叠形成稳定的茎环结构, 并符合相应筛选标准的核酸序列共 17 条, 代表 17 个茎环前体序列 (表 3 和图 1)。在这些前体序列上分布着分属于 17 个不同家族的 17 个 miRNA 的成熟序列

表 2 拼接获得的黄芪转录本数据基本情况

Table 2 Statistics of assembled transcripts of *A. membranaceus*

项目	数据
拼接获得的转录本数量	86 647
总长度/bp	70 565 316.8
平均长度/bp	814.4
最短序列/bp	201
最长序列/bp	12 112
GC 量/%	40.4
N50/bp	1 350



miRNA 的成熟形式用大写字母表示
The miRNA sequences are shown in capitals

图 1 部分 miRNA 前体的二级结构

Fig. 1 Secondary structures of four predicted stem-loop precursors

表 4 黄芪中新发现的 miRNA

Table 4 Novel miRNAs predicted from *A. membranaceus*

序号	miR 家族	名称	序列 (5'-3')	长度/nt	同源 miRNA	与同源 miRNA 的差异碱基数
1	156	ame-miR156a-5p	UUGACAGAAGAUAGAGAGCAC	21	ath-miR157a-5p	0
2		ame-miR156b-3p	UGCUCACUCUCUAUCUGUCACC	22	mtr-miR156b-3p	0
3		ame-miR156c-5p	UGACAGAAGAGAGUGAGCACA	21	bna-miR156a	0
4	159	ame-miR159e-5p	AGCUGCUAAGCUAUUGGAUCCC	21	gma-miR159d	1
5		ame-miR319c-3p	UUGGACUGAAGGGAGCUCCUUC	22	gma-miR319g	0
6	166	ame-miR166b-3p	UCGGACCAGGCUUCAUCCCCGU	22	csi-miR166b	0
7		ame-mi166l-3p	UCGGACCAGGCUUCAUCCCC	21	bdi-miR166a-3p	0
8	167	ame-miR167a-5p	UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUGA	22	ccl-miR167a	0
9	168	ame-miR168a-5p	CCCGCCUUGCAUCAACUGAAU	21	aly-miR168a-3p	0
10	169	ame-miR169c-5p	CAGCCAAGGGUGAUUUGCCGG	21	mtr-miR169c	0
11	2118	ame-miR2118-3p	UUACCGAUUCCACCCAUGCCU	21	mtr-miR2118	1
12	482	ame-miR482a-3p	UCUUUCCAUUCCGCCAUGCCUA	24	gma-miR482a-3p	2
13		ame-miR482a-5p	AGUUGUGGGAAUGGGAUUGGUUG	24	gma-miR482c-5p	3
14	5291	ame-miR5291a-3p	UGUAAACGGAUGGAUUGGAUGGAU	23	mtr-miR5291a	3
15	896	ame-miR896-3p	GGUUCGAAUCCUGCUGUCGACG	22	efu-miR-9277	3
16	3630	ame-miR3630-3p	UUGGGAAUCUCUCUGAUGCA	20	vvi-miR3630-3p	0
17	5287	ame-miR5287b-3p	UCUUAUAAAGUGGACCGGAGGUAG	24	mtr-miR5281b	3

在, 本研究随机选取了 8 条新发现的 miRNA, 通过茎环引物实时荧光定量 PCR 实验进行验证。结果显示, 8 条 miRNA 荧光定量扩增产物的熔解曲线均为单峰, 将 8 条 miRNA 荧光定量 PCR 产物进行琼脂

糖凝胶电泳, 8 条 miRNA 均出现明显单一条带, 大小约 60 bp, 与荧光定量 PCR 扩增产物的实际大小一致 (图 2), 证明生物信息学预测的 miRNA 在黄芪中确实存在。

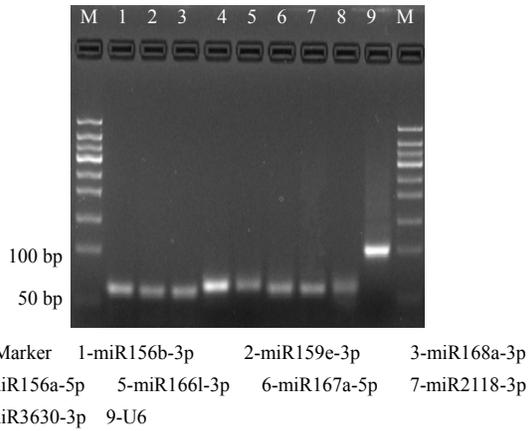


图 2 miRNA 茎环引物实时荧光定量 PCR 产物电泳图
Fig. 2 Electrophoresis of miRNA stem-loop qRT-PCR products

3.4 黄芪 miRNA 靶基因的预测及功能分析

根据预测的 17 条黄芪 miRNA 序列以及拼接获得的转录本序列，通过在线预测软件 psRNATarget 对获得的黄芪保守 miRNA 的潜在靶基因进行了预测，共预测出 17 个 miRNA 的 145 个靶基因。

采用 Blast 将这些靶基因在拟南芥基因组中比对，通过分析靶基因在拟南芥中的同源基因来解析其功能(表 5)。结果表明多数靶基因为转录因子编码基因，部分基因编码受体蛋白激酶，糖、脂类、氨基酸等物质代谢相关酶类分子以及防御反应和胁迫响应等相关蛋白。这些 miRNA 在其他植物中的靶基因多为黄芪 miRNA 靶基因的同源基因，说明这些 miRNA 在不同物种中的功能具有一定的保守性。对靶基因的功能

表 5 黄芪保守 miRNAs 靶基因预测结果

Table 5 Novel miRNA targets predicted from *A. membranaceus*

miRNAs	靶基因拟南芥同源基因座位号	靶基因在拟南芥中的同源基因	功能分类
miR156a-5p	AT1G14670	内膜蛋白 70 蛋白家族	膜泡运输
	AT1G48090	钙依赖性脂质结合家族蛋白	信号转导
	AT3G25070	RPM1 互作蛋白 4 RIN4	防御反应
	AT3G56940	二羧酸二铁蛋白 (Crd1)、CHL27、ACSF	物质代谢
	AT4G18250	受体丝氨酸/苏氨酸激酶	蛋白激酶
	AT4G39090	木瓜蛋白酶家族的半胱氨酸蛋白酶 RD19	蛋白水解
	AT5G28010	聚酮环化酶/脱水酶和脂质转运蛋白超家族	胁迫响应
	AT5G64440	脂肪酸酰胺水解酶 FAAH	脂质代谢
miR156b-3p	AT1G17500	E1-E2 型 ATP 酶家族蛋白/卤酸脱卤素水解酶家族蛋白	跨膜运输
	AT2G02800	蛋白激酶 APK2B	蛋白激酶
	AT2G37430	C2H2 和 C2HC 锌指超家族蛋白	转录因子
miR156c-5p	AT2G37170	PIP2B、PIP	跨膜运输
	AT3G21510	AHP1	信号转导
miR319c-3p	AT1G30210	TCP24	转录因子
	AT1G53230	TCP3	转录因子
	AT3G11440	MYB 结构域蛋白 MYB65	转录因子
	AT5G09880	Splicing factor、CC1-like	RNA 加工
	AT5G66530	半乳糖变旋酶超家族蛋白	物质代谢
miR166b-3p	AT1G52150	同源亮氨酸拉链家族蛋白、ATHB15、CAN、ICU4	转录因子
	AT1G73590	生长素的外输载体蛋白家族 PIN1、ATPIN1	生长发育
	AT2G34710	同源亮氨酸拉链家族蛋白/脂质结合启动域 PHB、ATHB14	转录因子
	AT5G19400	SMG7、端粒酶激活蛋白 Est1	防御反应
miR167a-5p	AT3G23730	木葡聚糖内转糖苷酶/水解酶 XTH16	生长发育
miR168a-5p	AT1G72930	toll/白细胞介素-1 受体	防御反应
	AT5G09220	AAP2	跨膜转运
miR169c-5p	AT1G72830	HAP2C、ATHAP2C、NF-YA3	转录因子

续表 5

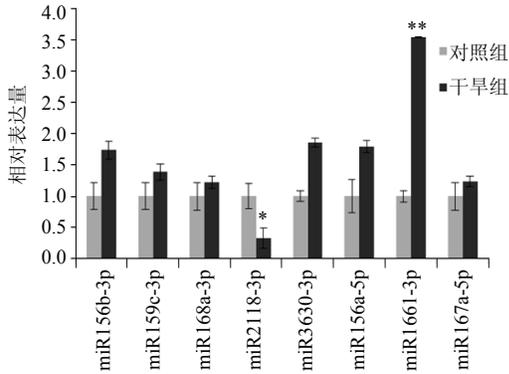
miRNAs	靶基因拟南芥同源基因座位号	靶基因在拟南芥中的同源基因	功能分类
miR2118-3p	AT1G27170	转录因子; ATP 结合	转录因子
	AT1G56720	蛋白激酶超家族蛋白	蛋白激酶
	AT1G63860	TIR-NBS-LRR 类抗病蛋白家族	抗病性
	AT5G17680	TIR-NBS-LRR 类抗病蛋白家族	抗病性
	AT5G36930	TIR-NBS-LRR 类抗病蛋白家族	抗病性
miR3630-3p	AT2G46020	CHR2, BRM, CHA2, 转录调控蛋白 SNF2	转录因子
	AT5G08370	α -半乳糖苷酶 2AGAL2	物质代谢
	AT5G60940	Transducin/WD40 重复样超家族蛋白	蛋白降解
miR482a-3p	AT3G62200	假定核酸内切酶或糖基水解酶	表达调控
	AT4G10710	SPT16	转录因子
	AT5G17680	TIR-NBS-LRR 类抗病蛋白家族	抗病性
	AT5G36930	TIR-NBS-LRR 类抗病蛋白家族	抗病性
	AT5G46470	TIR-NBS-LRR 类抗病蛋白家族	抗病性
miR482a-5p	AT5G64710	假定核酸内切酶或糖基水解酶	表达调控
	AT1G18390	蛋白激酶超家族蛋白	蛋白激酶
	AT1G28320	蛋白酶相关蛋白 DEG15	蛋白降解
	AT1G77290	谷胱甘肽 S-转移酶家族蛋白	防御反应
	AT3G14470	含 NB-ARC 结构域抗病蛋白	转录因子
	AT3G17365	S-腺苷基甲硫氨酸依赖性甲基转移酶家族蛋白	物质代谢
	AT4G22890	PGR5-LIKEA	物质代谢
	AT4G27500	质子泵互蛋白 1	物质运输
miR5287b-3p	AT5G52280	肌球蛋白重链相关蛋白	细胞骨架
	AT1G24020	MLP423	防御反应
	AT1G25350	谷氨酰胺 tRNA 连接酶、谷氨酰-tRNA 合成酶	翻译
	AT1G52280	RAB GTPase homolog G3D	膜泡运输
	AT1G71380	ATGH9B3、ATCEL3、CEL3	物质代谢
	AT3G51990	蛋白激酶超家族蛋白	蛋白激酶
	AT4G01730	DHHC 型锌指蛋白家族	转录因子
	AT5G38560	蛋白激酶超家族蛋白	蛋白激酶
miR5291a-3p	AT1G74770	锌离子结合	跨膜转运
	AT2G45680	TCP 转录因子家族	转录因子
	AT5G62700	微管蛋白 β 链 3 TUB3	细胞骨架
miR896-3p	AT1G08350	内膜蛋白 70 蛋白家族	膜泡运输

能分类分析表明,在黄芪中,预测的 miRNA 参与了转录调节、物质代谢、信号转导、物质运输、胁迫应答以及蛋白翻译后修饰等多种生物学过程。

3.5 黄芪 miRNA 的表达模式分析

从预测的黄芪 17 个 miRNA 中随机选取 8 个 miRNA 进行实时定量 PCR,分析干旱胁迫对于这些 miRNA 表达的影响(图 3 和图 4)。图 3 的数据显示,干旱胁迫后黄芪叶中 miR156b-3p、miR159e-3p、

miR168a-3p、miR3630-3p、miR156a-5p、miR166l-3p 和 miR167a-5p 的表达上调,其中 miR166l-3p 的表达极显著上调 ($P < 0.01$),而 miR2118-3p 的表达显著下调 ($P < 0.05$)。从图 4 可以看出,干旱胁迫后黄芪根中 miR159e-3p、miR168a-3p、miR166l-3p 的表达表现为下调的趋势,其中 miR168a-3p 的表达显著下调 ($P < 0.05$),而 miR2118-3p 的表达则极显著上调 ($P < 0.01$)。表明 miR2118、miR166l 和 miR168a



与对照组比较: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, 下同
* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs control group, same as below

图 3 黄芪叶中 8 个 miRNA 在干旱胁迫下的表达情况
Fig. 3 Expression of eight miRNAs in *A. membranaceus* leaves under drought stress

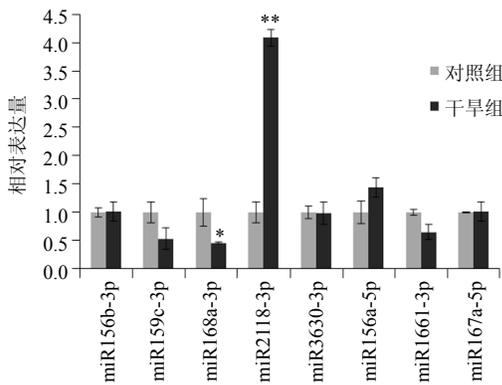


图 4 黄芪根中 8 个 miRNA 在干旱胁迫下的表达情况
Fig. 4 Expression of eight miRNAs in *A. membranaceus* roots under drought stress

可能参与黄芪的干旱胁迫应答过程。

4 讨论

由于缺乏基因组用于寻找 miRNA 的前体, 对于缺乏基因组信息的植物物种来说, 其 miRNA 鉴定工作难度较大。但随着高通量测序技术的发展, 这一局面有所改变。在最近的一些报道中, 研究者利用转录组测序技术、小 RNA 测序以及基因组调查测序 (GSS) 技术对一些中草药植物进行了测序, 并在此基础上进行了 miRNA 的鉴定, 取得了较好的效果。如 Qiu 等^[18]运用高通量测序技术从红豆杉中鉴定出 56 个保守 miRNA。Wu 等^[19]使用高通量测序技术鉴定人参小分子 RNA 及其靶基因, 鉴定了一些非保守 miRNA, 其中, miR6136b、miR6135k、miR6139、miR6140d、miR6140 与高温和干旱胁迫应答有关。Wu 等^[20]利用转录组测序分析, 从毛地黄中鉴定出 13 个保守的 miRNA, 预测到 25 个

miRNA 的靶基因。这些研究说明, 随着组学技术的快速发展, 转录组测序、小 RNA 测序等高通量测序技术可为非模式植物的 miRNA 的鉴定提供数据支持, 促进中草药 miRNA 的研究。

本研究利用黄芪高通量测序数据和生物信息技术鉴定到 17 个 miRNA, 预测到 145 个响应靶基因, 这些靶基因参与生长发育、物质代谢、胁迫应答等一系列重要的生物学过程。本研究对其中 8 个 miRNA 的干旱胁迫表达模式进行了分析, 为理解 miRNA 在黄芪中的功能奠定了基础。保守 miRNA 在不同植物中调控的靶基因也存在同源性。例如拟南芥中 miR169 的靶基因可以编码 NF-YA (Nuclear transcription factor Y subunit alpha) 转录因子, 本研究预测的黄芪 miR169 的靶基因也包括此靶基因。此外, 与其他植物类似, 黄芪 miRNA 的部分靶基因参与植物的抗逆境胁迫过程, 例如 miR482 和 miR2118 的靶基因所编码的 NBS-LRR 型抗性蛋白参与植物防御应答过程中的抗病反应。

黄芪的药用部分根部含有黄芪皂苷、多糖、黄酮等多种有效成分, 这些药效活性成分是黄芪的次生代谢产物, 当受到干旱、冷害等环境胁迫后, 植物体内可以通过信号转导、基因表达、酶的合成及各种酶促反应等不同层次影响次生代谢过程, 从而显著提高次生代谢物产量^[21], 而 miRNA 作为植物逆境胁迫适应过程中的一类重要的调控因子, 直接参与胁迫应答过程, 分析黄芪 miRNA 对干旱胁迫的应答对于研究黄芪次生代谢产物的调控机制具有重要意义。本研究对黄芪 miRNA 进行干旱表达模式分析, 发现 miR168a、miR2118 和 miR1661 可能在黄芪干旱逆境应答中发挥调控作用。

有研究结果显示, miR168 在植物干旱胁迫响应中起到重要的调控作用, 如玉米的 miRNA168 在干旱胁迫后也呈现差异性表达^[22]; 在拟南芥中 miR168 受到干旱胁迫诱导^[23]; 丹参在干旱胁迫处理后, miR168 在丹参叶中的表达呈现出显著性上调^[24]。与其他植物类似, 本研究中黄芪在干旱胁迫后, miR168 亦受到干旱胁迫诱导, 在叶中的表达呈现出上调的趋势, 在根中是显著下调表达, 表明 miR168 在黄芪的干旱胁迫应答过程中发挥着重要作用。

miR2118 在豆科植物中是高度保守的, 其功能是调节编码 TIR-NBS-LRR 抗病蛋白的基因的表达, 并且在豆科植物中与干旱胁迫应答密切相关。有研究发现大豆 miR2118 受干旱胁迫诱导后, 在根和

叶中的表达均是上调的,这表明 miR2118 可能参与大豆苗期的干旱应答^[25]。对 miR2118 在豆科植物中间锦鸡儿中对于干旱胁迫响应的作用进行研究,发现 miR2118 及其靶基因在根、茎和叶中随着干旱的时间增加,均表现出上调表达,表明 miR2118 及其靶基因受干旱胁迫诱导,并且能通过调控 miR2118 及其靶基因的表达使植物适应干旱环境^[26]。但在本研究中,在干旱胁迫诱导之后,miR2118 在黄芪的根和叶中的表达存在差异,在叶中的表达是显著下调的,而在根中则是极显著上调的,由此说明 miR2118 在黄芪叶片和根中响应干旱的具体调控作用存在差异。

MIR166 基因家族是高度保守、成员众多的一个 miRNA 基因家族^[27],广泛存在于多种植物中。经长期进化而产生的 MIR166 基因家族在植物生长发育和胁迫响应中发挥非常重要的调控作用^[28]。研究表明,miR166 是有一个高度保守的靶基因,即编码 III 类同源结构域的亮氨酸拉链蛋白家族(HD-ZIP III),HD-ZIP III 转录因子家族含有 4 个基因,包括 PpHB14、PpHB15、PpHB8 和 PpREV,这些基因是植物特有的,调节植物发育的关键部分,包括侧器官极性、顶端和侧生分生组织的形成和血管发育等^[29]。而本研究预测的 miR166 的其中 2 个靶基因就分别含有 ATHB15 和 ATHB14,是属于 HD-ZIP III 转录因子家族基因编码的蛋白,这与已有研究报道相似,说明 miR166 及其靶基因的高度保守性。在本研究中,受干旱胁迫诱导之后,miR166 在黄芪叶中的表达是极显著上调的,在根中表现出下调的趋势;而 miR166 在其他植物的干旱胁迫响应研究也有报道,如干旱可以诱导藜苜蓿、野生二粒小麦和大麦中 miR166 的表达^[28];丹参在干旱胁迫处理后,miR166 在丹参叶中的表达呈现出显著性上调^[24]。综上所述,表明 miR166 在植物干旱胁迫响应过程中发挥重要的调控作用。

随着药用植物 miRNA 研究的不断深入,以及高通量测序技术的进一步发展,将发掘到更多的黄芪 miRNA 及其靶基因。这些工作将为研究 miRNA 对黄芪次生代谢产物调控提供基础,为进一步利用基遗传工程技术改良黄芪的遗传品质,培育抗逆性好、有效成分量高的黄芪新品种提供科学依据。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.

[2] 达美君. 补药之长——黄芪的名方今用 [J]. 家庭健康:

医学科普, 2015(2): 53.

- [3] 艾佳, 李永光, 王涛. 植物逆境 microRNA 的研究进展 [J]. 基因组学与应用生物学, 2014, 33(5): 1154-1160.
- [4] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* [J]. *Cell*, 1993, 75(5): 843-854.
- [5] Reinhart B J, Slack F J, Basson M, et al. The 21 nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 2000, 403(6772): 901-906.
- [6] Reinhart B J, Weinstein E G, Rhoades M W, et al. MicroRNAs in plants [J]. *Genes & Development*, 2002, 16(13): 1616-1626.
- [7] Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data [J]. *Nucl Acids Res*, 2014, 42(D1): 68-73.
- [8] Budak H, Akpinar B A. Plant miRNAs: biogenesis, organization and origins [J]. *Funct Integr Genomics*, 2015, doi: 10.1007/s10142-015-0451-2.
- [9] 曾奇峰, 曾光尧, 周应军. MicroRNA 与药用植物 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2015, 31(4): 346-351.
- [10] 周芳名, 白志川, 卢善发. 药用植物 microRNA [J]. 中草药, 2013, 44(2): 232-237.
- [11] 易炳学, 余书琦, 张金莲, 等. 黄芪的研究概况 [J]. 江西中医药大学学报, 2014, 26(2): 98-100.
- [12] Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114-2120.
- [13] Cox M P, Peterson D A, Biggs P J. SolexaQA: At-a-glance quality assessment of Illumina second-generation sequencing data [J]. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11: 485-496.
- [14] Grabherr M G, Haas B J, Yassour M, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(7): 644-652.
- [15] 李华云, 王宁, 韦春香, 等. 甘草 microRNA 及其靶基因的生物信息学预测 [J]. 中草药, 2016, 47(14): 2506-2514.
- [16] Dai X, Zhao P X. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39: 155-159.
- [17] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [18] Qiu D, Pan X, Wilson I W, et al. High throughput

- sequencing technology reveals that the taxoid elicitor methyl jasmonate regulates microRNA expression in Chinese yew (*Taxus chinensis*) [J]. *Gene*, 2009, 436(1/2): 37-44.
- [19] Wu B, Wang M, Ma Y, *et al.* High-throughput sequencing and characterization of the small RNA transcriptome reveal features of novel and conserved microRNAs in *Panax ginseng*. [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e44385.
- [20] Wu B, Li Y, Yan H, *et al.* Comprehensive transcriptome analysis reveals novel genes involved in cardiac glycoside biosynthesis and mlncRNAs associated with secondary metabolism and stress response in *Digitalis purpurea* [J]. *Bmc Genomics*, 2012, 13(13): 15-19.
- [21] 梁建萍, 贾小云, 刘亚令, 等. 干旱胁迫对蒙古黄芪生长及根部次生代谢物含量的影响 [J]. *生态学报*, 2016, 36(14): 2-3.
- [22] 安 明. 玉米 microRNA159 和 microRNA168 在干旱胁迫下的差异表达 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2011.
- [23] Liu H H, Tian X, Li Y J, *et al.* Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Rna-a Publication of the Rna Society*, 2008, 14(5): 836-843.
- [24] 罗书芳, 崔浪军, 王 健, 等. 干旱胁迫下 15 种丹参 miRNAs 差异表达分析 [J]. *广东农业科学*, 2013, 40(5): 134-137.
- [25] 罗中钦. 大豆逆境胁迫相关 microRNA 的发掘与验证 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2012.
- [26] Wu B F, Li W F, Xu H Y, *et al.* Role of cin-miR2118 in drought stress responses in *Caragana intermedia* and Tobacco [J]. *Gene*, 2015, 574(1): 34-40.
- [27] Wang Z, Jin H, Chen Q, *et al.* Evolution analysis about soybean MIR166 family [J]. *J Northeast Agri Univ*, 2015, 22(1): 22-29.
- [28] 刘海丽. miR192、miR166 及其靶基因 HD-Zip 对水稻镉胁迫应答的功能研究 [D]. 北京: 中国计量学院, 2013.
- [29] Zhang C H, Zhang B B, Ma R J, *et al.* Isolation and expression analysis of four HD-ZIP III family genes targeted by microRNA166 in peach [J]. *Genetics & Mol Res Gmr*, 2015, 14(4): 14151-14161.