

# 苹果‘金冠’AGO1 基因克隆及与发育相关 miRNA 表达分析

鹿游 马超 孟冬 李天忠\*

(中国农业大学 农学与生物技术学院,北京 100193)

**摘要** 为明确 miRNA 沉默靶基因的调控机理,克隆 AGO1 蛋白基因并了解其作为沉默复合物核心成员在 miRNA 沉默通路中的作用,本研究在分析‘金冠’苹果基因组的基础上,以‘金冠’叶片 cDNA 为模板,克隆获得了 3 234 bp AGO1 基因全长,蛋白分子质量为 119 ku,等电点为 9.41,包含 2 个保守的 AGO 蛋白特征结构域:PAZ 和 Piwi 区,命名为 *MdAGO1*。苹果‘金冠’不同组织 *MdAGO1* 基因及 13 种与发育相关 miRNA 实时定量 PCR 分析结果表明:1) *MdAGO1* 在花和果实中表达量均高于叶片;2) miRNA 在果实和花中表达量均较高,叶片相对较低。*MdAGO1* 与 13 种发育相关 miRNA 表达一致,在苹果中 *MdAGO1* 可能与 miRNA 协同作用调控植物的生长发育。

**关键词** 苹果; AGO1; 基因克隆; 发育相关 miRNA; 表达分析

中图分类号 S 661.1

文章编号 1007-4333(2013)05-0069-08

文献标志码 A

## Clone and expression of AGO1 gene and development-related miRNA in apple(Golden Delicious)

LU You, MA Chao, MENG Dong, LI Tian-zhong\*

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract** As the internal component of RNA induced silencing complex, ARGONAUTE(AGO) protein plays an important role in all known small RNA-directed regulatory pathways. In this study, the target cDNA clone of AGO1 was isolated from library prepared from Golden Delicious using RT-PCR technique. The cDNA was 3 234 bp, and would encode a protein of 1 078 amino acid with a molecular mass of 119 ku and theoretical isoelectric point of 9.41. The protein contained 2 conserved domains, PAZ and Piwi. Quantitative real-time PCR analysis revealed that *Md-AGO1* was higher in flower and fruit than leaf. The abundance of detected development related miRNA were positively correlated to *Md-AGO1*. *Md-AGO1* and miRNA may regulate the plant growth and development together in apple.

**Key words** apple; AGO1; gene clone; development-related miRNA; expression analysis

随着植物 RNA 干扰研究的不断深入,miRNA 调控通路中相关蛋白的研究逐渐成为焦点。AGO 蛋白作为 RNA 诱导的沉默复合物的核心组分,在已知 miRNA 调控通路中发挥着重要作用<sup>[1]</sup>。AGO 蛋白一般包含 2 个保守的特征结构域:PAZ 和 Piwi 区。PAZ 区含有  $\beta$  桶结构能够识别并结合非特异单核苷酸链的 3'端;Piwi 区具有切割 mRNA 的活性中心。拟南芥中目前已发现 10 种 AGO 蛋白,其中 AGO1 是目前研究中所发现的功能最重要、参与

通路最多的一类,其在与 miRNA 共同调控植物生长发育过程中起着重要作用<sup>[2-3]</sup>。在植物体中, RNA 前体转录后自身折叠形成茎环二级结构并由 DCL1 酶切割形成 miRNA,然后所形成的 miRNA 会与 AGO1 蛋白结合形成 RNA 诱导沉默复合体,该复合体会结合靶基因并通过识别特异性位点切割靶基因来控制靶基因表达,进而调控植物的生长和发育<sup>[4-5]</sup>。

目前关于 miRNA 的研究主要集中在拟南芥等

收稿日期:2013-02-05

基金项目:科技部科技基础性工作专项(2012 FY110100)

第一作者:鹿游,硕士研究生,E-mail:luyourebecca@163.com

通讯作者:李天忠,博士,教授,主要从事果树生理与分子生物学研究,E-mail:litianzhong1535@163.com

模式植物的发育模式、信号传导、miRNA 合成和抗逆反应等方面。关于 miRNA 如何调控植物生长发育,在拟南芥中已被广泛研究,如 miR156 调控植株形态建成和花发育;miR160 在花器官形成中具有重要调控作用等;miR164 与花发育和叶形态建成有关;miR172 通过调控 AP1 基因的表达引起早花现象;miR319 可能通过控制细胞分裂影响叶的形态建成,导致叶片卷曲等<sup>[6-9]</sup>。目前有关 miRNA 功能的研究大多集中在拟南芥和水稻等模式植物,而与苹果等以果实生产为主的果树,在果实发育上具有较大差别。此外,木本植物中 miRNA 干扰方面仅杨树<sup>[10]</sup>有较多研究,而果树中报道较少,我国果树生产中产量最高、具有很高经济附加值的苹果的相关研究更是严重缺乏。miRNA 的功能多样性及其具有砧木和接穗间传递的特点使其在以嫁接为主要繁殖和保存方式的果树中作用更加明显<sup>[11-12]</sup>,因此,研究 miRNA 如何调控苹果发育,一方面可以丰富有关 miRNA 调控机制的理论知识,另一方面可以应用其进行苹果特别是砧木遗传改良,提高苹果果实品质。

本研究利用已测序完成的苹果‘金冠’全基因组数据库<sup>[13]</sup>,通过生物信息学方法系统分析了苹果基因组中的 *AGO1* 基因,克隆获得了苹果 *AGO1* 基因全长,命名为 *MdAGO1*,通过实时定量 PCR 检测与植物生长发育相关 miRNA 在不同组织中的表达差异,并对 miRNA 在苹果中的靶基因进行预测,探索 *MdAGO1* 蛋白与 miRNA 在调控苹果生长发育过程中的作用,旨在为通过 miRNA 进行苹果果实品质的转基因改良提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

苹果‘金冠’取自中国农业大学上庄实验站,采取不同部位苹果成熟组织:叶片、花和果实。液氮速冻,然后将材料放于-80℃超低温冰箱中储存备用。

### 1.2 *AGO1* 基因的生物信息学分析及克隆

#### 1.2.1 数据来源及 *AGO1* 基因的鉴定

主要通过 2 种分析方法对 *AGO1* 基因进行鉴定:一是利用 PFAM 网站(<http://pfam.sanger.ac.uk/>)对苹果全基因组蛋白序列进行结构分析,获得

苹果基因的蛋白结构域信息,筛选含有编码 PAZ 和 Piwi 结构域的蛋白;二是从 NCBI 数据库下载苹果全基因组 CDS 序列及蛋白序列文件,构建本地 Blast 数据库,然后以拟南芥 *AGO1* 家族基因序列执行本地 Blast(1e-003)搜索。通过将两部分结果进行合并,利用 Perl 程序去掉重复序列,所得结果再利用 PFAM,SMART 及 NCBI-CDD 等蛋白质分析工具进行蛋白结构预测,删除不属于 *AGO1* 的基因,共得到 2 条序列(MDC016112.100 和 MDC017371.127contig),经比对发现这 2 条序列同源性较高,故采用其中一条序列(MDC017371.127contig)进行后续试验。

#### 1.2.2 ‘金冠’*AGO1* 基因的克隆

CTAB 法提取‘金冠’嫩叶中总 RNA,去除 DNA 后参照 TAKARA 反转录试剂盒(D6210A)进行 cDNA 的合成。根据预测得到的序列信息,设计基因克隆特异性引物 AGO-F: 5'-ATGAGTGG-ATTCTTTGAGTTGT-3', AGO-R: 5'-ATACT-AACCGACAGACATCTAAA-3',以‘金冠’叶片 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 产物经琼脂糖凝胶回收后连接到 pMD18-T 载体后,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,挑取阳性克隆送上海生工测序。

#### 1.2.3 *AGO1* 基因的序列分析及蛋白质结构预测

利用 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)预测 *AGO1* 基因开放阅读框,在线工具 ExPasy(<http://expasy.org/>)分析 *AGO1* 蛋白分子量、等电点和蛋白疏水性, TMHMM 网站(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)分析 *AGO1* 蛋白跨膜区, SignalP 网站(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测其信号肽。PFAM(<http://pfam.sanger.ac.uk/>)分析 *AGO1* 蛋白质功能域,利用 MUSCLE 网站对苹果 *AGO1* 蛋白和拟南芥 AGO 蛋白家族进行序列比对,再利用 MEGA5 构建进化树。进化树生成算法采用邻接法(Neighbor-Joining, NJ),校验参数 Bootstrap 重复 1 000 次。

#### 1.2.4 miRNA 的克隆

下载 miRBase(<http://www.mirbase.org/>)中 miRNA 序列,利用茎环引物法克隆‘金冠’苹果 miRNA。将‘金冠’苹果叶片、花和果实的纯化并去除 DNA 后的经核酸蛋白测定仪(Nanodrop ND-

1000)定量 1  $\mu\text{g}$  的 RNA 混合,然后取 1  $\mu\text{L}$  进行逆转录反应。茎环引物、正向引物、反向引物设计遵循其基本原则<sup>[14]</sup>。根据各 miRNA 序列设计长 45 bp 的茎环引物进行特异性逆转录反应,其中 35 bp 为各个 miRNA 通用部分:GTCACATCGTATCG-TGAAGCTGCGCAGCTGATGTG,该序列与各个

miRNA 均不形成二级结构;克隆 miRNA 所用反向引物均为 ACATCGTATCGTGAAG。以‘金冠’混合 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 产物经琼脂糖凝胶回收后连接到 pMD18-T 载体后,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,挑取阳性克隆送上海生工测序。共克隆得到 13 个发育相关 miRNA,其引物序列见表 1。

表 1 miRNA 反转录及实时定量 PCR 引物

Table 1 miRNA reverse transcription and real time PCR primers

miRNA	反转录引物 Reverse transcription primers	正向引物 Forward primers
miR156	GTCACATCGTATCGTGAAGCTGCGCAGCTGATGTGACGTGCTCAC	TGCACTAGCGTGTGACAGAAGA
miR157	GTCACATCGTATCGTGAAGCTGCGCAGCTGATGTGACGTGCTCAC	TGCACTAGCGTGTGACAGAAG
miR159	GTCACATCGTATCGTGAAGCTGCGCAGCTGATGTGACTAGAGCTC	TGCACTAGCGTGTGGATTGA
miR160	GTCACATCGTATCGTGAAGCTGCGCAGCTGATGTGACTGGCATAAC	TGCACTAGCGTGTGCTGGCTC
miR164	GTCACATCGTATCGTGAAGCTGCGCAGCTGATGTGACAGCATGTG	TGCACTAGCGTGTGGAGAAGCA
miR166	GTCACATCGTATCGTGAAGCTGCGCAGCTGATGTGACGGGAATG	TGCACTAGCGTGTGGACCAGG
miR167	GTCACATCGTATCGTGAAGCTGCGCAGCTGATGTGACAAGATCAT	TGCACTAGCGTGTGAAGCTGCC
miR168	GTCACATCGTATCGTGAAGCTGCGCAGCTGATGTGACTTCCCGAC	TGCACTAGCGTGTGCTTGGTG
miR169	GTCACATCGTATCGTGAAGCTGCGCAGCTGATGTGACCAGGCAAG	TGCACTAGCGTGTAGCCAAGGA
miR172	GTCACATCGTATCGTGAAGCTGCGCAGCTGATGTGACGTGCAGCA	TGCACTAGCGTGAGAATCCTGA
miR395	GTCACATCGTATCGTGAAGCTGCGCAGCTGATGTGACGAGTCCC	TGCACTAGCGTGTGAAGTGTT
miR396	GTCACATCGTATCGTGAAGCTGCGCAGCTGATGTGACAAGTCAA	TGCACTAGCGTGTCCACAGCT
miR403	GTCACATCGTATCGTGAAGCTGCGCAGCTGATGTGACCGAGTTTG	TGCACTAGCGTGTAGATTAC
5srRNA	GTCACATCGTATCGTGAAGCTGCGCAGCTGATGTGACTGGATTGG	TGCACTAGCGTGTAGAGGAACC

1.2.5 miRNA 的靶基因的预测

利用苹果全基因组序列构建本地 Blast 数据库,将 miRNA 与苹果基因组反向比对,按照错配、冗余数 $\leq 2$ 的原则确定各个 miRNA 在基因组中的可能靶位点。由于苹果基因组数据库中 Cds 序列有限,因此利用 <http://srna-tools.cmp.uea.ac.uk/> 网站中苹果 Cds 序列数据库对这些 miRNA 的功能进行预测,同时结合网站中拟南芥等多种植物的数据对苹果 miRNA 的靶基因功能作出预测。

1.3 实时荧光定量分析

1.3.1 miRNA 在不同组织中的表达分析

苹果‘金冠’叶片、花和果实总 RNA 进行纯化并去除 DNA,然后各取 1  $\mu\text{g}$ (经核酸蛋白测定仪定量),分别进行反转录反应。荧光定量反应参照 Feng 等<sup>[15]</sup> 步骤进行,略有改动。通过引入 5S rRNA 作为内参基因矫正反转录误差。各 miRNA

反转录引物分别与 5S rRNA 反转录引物等量混合后取 1  $\mu\text{L}$  进行反应。使用 BIO-RAD CFB-3260G PCR 仪进行荧光定量 PCR,进行 3 次重复。利用荧光定量试剂盒(SYBR Green real time PCR master mix,TOYOBO)测定 miRNA 的表达量,步骤参照试剂盒说明进行。10  $\mu\text{L}$  反应体系包括:dd H<sub>2</sub>O 3.8  $\mu\text{L}$ ,上、下游引物(10 pmol/ $\mu\text{L}$ )各 0.2  $\mu\text{L}$ ,cDNA 模板 1  $\mu\text{L}$ ,SYBR Green real time PCR master mix 5  $\mu\text{L}$ 。荧光定量 PCR 反应条件为:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s,94  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 s,55  $^{\circ}\text{C}$  复性 5 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 20 s,循环 40 次后,94  $^{\circ}\text{C}$  1 min,50  $^{\circ}\text{C}$  30 s 之后 0.01  $^{\circ}\text{C}/\text{s}$  收集荧光信号,做溶解曲线。利用 2<sup>- $\Delta\Delta\text{Ct}$</sup>  法计算 miRNA 相对表达量<sup>[16]</sup>。

1.3.2 MdAGO1 在不同组织表达分析

CTAB 法提取苹果‘金冠’叶片、花、果实的总 RNA,纯化并去除 DNA 后各取 1  $\mu\text{g}$ ,用于

*MdAGO1* 基因的实时定量表达分析,其 cDNA 合成参照 TAKARA 反转录试剂盒进行。设计实时定量 PCR 引物 AGO-qF: 5'-TAAATCAGTCAGGTT-CCCCT-3', AGO-qR: 5'-GGTGGAGGTCTTT-GTCAGGTA-3', 荧光定量方法同上。

## 2 结果与分析

### 2.1 *MdAGO1* 的克隆与序列分析

以‘金冠’叶片 cDNA 为模板利用特异性引物 AGO1-F 和 AGO1-R 进行 PCR 扩增,测序结果表明其为一个 3 年 540 bp 序列,包含起始和终止密码子,开放阅读框为 3 234 bp,编码 1 078 个氨基酸。将苹果 AGO1 蛋白与现有的拟南芥 10 个 AGO 蛋白家族进行多重序列比对,结果发现苹果 AGO1 蛋白与 AtAGO1 相似性最高(78.98%),于是本研究将对应的基因命名为 *MdAGO1*。预测蛋白质分子量为 119 ku,理论等电点(PI)为 9.41。PFAM 数据库检索显示,*MdAGO1* 含有 2 个保守的结构域:PAZ(413-550 aa)和 Piwi(703-1024 aa)结构域(图 1)。

```

MVRKRRTLSPGQSSSESHPEFAGHGSGQRAPERTFPQQQAGGAGNYQ
GGRGPAFQGGRRSGYGGRRGGRGVFPQQQYGGFQPEYEQQQYGGFQ
EIQARGRGGFTQQGGRSGYGGRRGGRGVFPQQQYGGFQPEYEQQQYGGFQ
LHQATLTVYQCGAETHQVFPYQGLTSPFVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVY
QLAVLTVYQCGAETHQVFPYQGLTSPFVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVY
KANHFPAELPDKDLHQYDVTIPEVTSRGGVNRVAVMEQLVLTLYRE
SHLGKRLPAYDGRKSLYTAGPLPFLSKEPKITLTDGDDGPGGQR
RERFRVVIKFAARADLHHLGLFLGGRQADAPQEAALQVLDIVLR
ELPTSRVYCFVGRSFYAPGLGRRQSLGEGLESWRGFSYQSIPTQM
GLSLNIDMSSTAFIEPLPVLVIEVTVQLNLRDVTTRPLSDSRRVKI
KKALRGVVKVEVTHRGNMRRKRYRISGLTSAVRELTFPVDERTGM PAZ
KSVVYFYETVYFVIQHAQWPCLOVQNGQRPNYLPEVVKRIVEG
QRYSKRLNERQITALLKVTQCRPHDRDODIIRTVRHNAYHEDPY
AREFGIKISENLAQVEARILPAPLWKKYHDTGRENDCLPVGQWN
MNMKMWVGGVNWICINERFNVQDSVRSFCNELACMCIYGG
MAFNPEFVLPPLGARPDQAEKALKTRVHDAMTKLHRSKELDLE
VVIPLDNNNGNLYGDLKRICETDGLVLSQCCLTKHVKMKSQYLA
NVALKNNVKGGRNVVLDLALSRRIPLVSDRPTIIPGADVTHPH
PGEDSSPSTAAVVASQDWPEITKYAGLVCAQHRQELIQDLFKT
WQDPQRGTVTGMIKELLISFRATGQKQRIIFRYRDVSGEGF PiWi
YQVLLYELDAIRKACASLEPNYQPPFVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVY
NDRNAVDRSGNIPGTVVDSKICHTPEFDFVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVY
AHYHVLDENKFTADELQSLTNNLCYFARCTRSVSIYVPPAYYA
HLAAFRARFVMEPETS DSGSMTSGAFGRGGGGMGPRSTRAPG
ANAARVPLPALKENVKRVMFYC<

```

图 1 *MdAGO1* 氨基酸序列及结构域分析

Fig. 1 Amino acids alignment and domain of *MdAGO1*

将 *MdAGO1* 蛋白序列和拟南芥基因组中的 AGO 蛋白序列进行系统进化树分析,结果发现,*MdAGO1* 与 AtAGO1 在系统进化树中处于较近的分支,说明它们之间的同源性较高(图 2)。

蛋白亲疏水性分析预测结果表明 *MdAGO1* 的氨基酸序列具有较高的亲水性,亲水区域明显大于疏水区域(图 3),跨膜结构和信号肽分析预测表明 *MdAGO1* 蛋白不存在跨膜结构域和信号肽,推测 *MdAGO1* 蛋白是一种非分泌、亲水性蛋白。

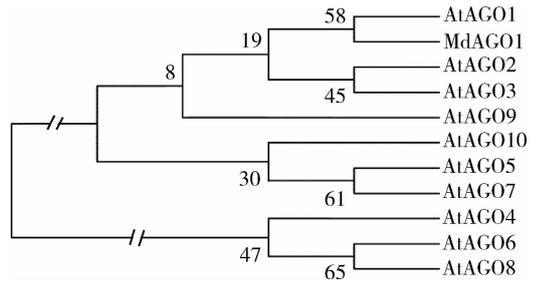


图 2 苹果与拟南芥 AGO 蛋白的系统进化树

Fig. 2 Unrooted neighbor joining phylogenetic tree of AGO in apple and *Arabidopsis*

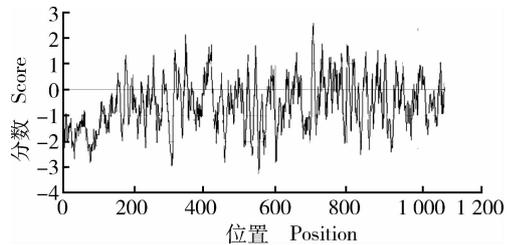


图 3 苹果 *MdAGO1* 的疏水性/亲水性分析

Fig. 3 Hydrophobicity/hydrophilicity analysis of amino acids of *MdAGO1*

### 2.2 发育相关 miRNA 的靶基因预测

用本研究克隆得到的苹果发育相关 miRNA 与苹果基因组进行比对之后,得到 13 个 miRNA 的靶基因序列(表 2)。这些靶基因按其功能可分为 4 类:编码转录因子;编码与植物代谢有关的酶蛋白;编码与信号转导有关的蛋白质;编码功能不清楚或未知功能的蛋白质。在预测得到的靶基因中,功能已知的靶基因大多编码转录因子,miRNA 通过调节这些转录因子的表达,从而调控植物的生长发育。

结合对 miRNA 靶基因的预测和靶基因在拟南芥等模式植物中的作用进行分析,在 miRNA 在苹果发育中的功能主要有以下几个方面:调控植物器官的形态建成,如 miR166 靶向 HD-ZIP 转录因子,该转录因子调控叶片极性发育相关基因<sup>[17]</sup>, miR172 通过靶向 AP2 基因调控花器官的发育<sup>[5]</sup>;参与植物激素应答途径,如 miR160 和 miR167 都靶向生长素响应因子,miR159 的表达水平受 GA 诱导<sup>[18]</sup>;参与自身代谢的反馈途径,如 miR403 的靶基因为 AGO2;参与信号转导和营养代谢,miR164 调控 NAC 基因的信号转导途径影响叶片和花的发育<sup>[19]</sup>。

表2 苹果 miRNA 的靶基因预测

Table 2 Prediction of miRNA target in apple

miRNA	靶位点 Target site	靶蛋白 Target protein	靶基因功能 Gene function
miR156	MDC000565. 206, MDC000760. 247, MDC000760. 256, MDC001075. 119, MDC002074. 373, MDC003581. 248, MDC007399. 176, MDC007988. 188, MDC008000. 235, MDC008031. 166, MDC009541. 244, MDC010428. 318, MDC010428. 318, MDC011842. 339, MDC013580. 195, MDC015520. 219, MDC019519. 287, MDC022241. 434, MDC022546. 57, MDC022628. 321, MDC038184. 5, MDC002441. 399, MDC004319. 233, MDC007657. 477, MDC019224. 77, MDC007657. 477, MDC002621. 233, MDC012217. 482, MDC018442. 71, MDC018690. 154	Squamosa 启动子结合蛋白 含组氨酸磷酸转移蛋白	转录因子 信号转导
miR157	MDC000565. 206, MDC000760. 247, MDC000760. 256, MDC001075. 119, MDC002074. 373, MDC003581. 248, MDC007399. 176, MDC007988. 188, MDC008000. 235, MDC008031. 166, MDC009541. 244, MDC010428. 318, MDC010428. 318, MDC011842. 339, MDC013580. 195, MDC015520. 219, MDC019519. 287, MDC022241. 434, MDC022546. 57, MDC022628. 321, MDC038184. 5, MDC002441. 399, MDC004319. 233, MDC007657. 477, MDC019224. 77, MDC000394. 210	未知蛋白	未知功能
miR159	MDC003459. 361, MDC005081. 699, MDC006048. 444, MDC007814. 144, MDC009250. 269, MDC009430. 318, MDC011193. 361, MDC011193. 509, MDC011566. 500, MDC015052. 82, MDC015178. 403, MDC017733. 199, MDC019662. 161, MDC020913. 219, MDC026449. 10, MDC008976. 153	MYB 蛋白; 丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶; TCP 家族; RNA 聚合酶	转录因子 代谢
miR160	MDC015910. 528, MDC020082. 231, MDC020082. 233, MDC021168. 418, MDC003302. 375, MDC005153. 453, MDC009317. 375, MDC015992. 380, MDC021367. 355	生长素响应因子	转录因子
miR164	MDC019151. 253, MDC012442. 263	NAC 家族蛋白	转录因子
miR166	MDC001760. 86, MDC012450. 285, MDC019868. 259, MDC029725. 34	HD-ZIP 蛋白	转录因子
miR167	MDC002798. 552, MDC006026. 285, MDC011446. 235, MDC015051. 52, MDC015374. 161, MDC016665. 144	生长素响应因子 MADS-box 蛋白	转录因子 信号转导
miR168	MDC011509. 322	富脯氨酸家族蛋白	转录因子
miR169	MDC001494. 456, MDC003479. 331, MDC005094. 389, MDC007341. 182, MDC007341. 194, MDC009782. 580, MDC013811. 288, MDC021069. 92, MDC022885. 46, MDC008409. 121, MDC008409. 172	NFYA5 转录子	转录因子
miR172	MDC001582. 391, MDC007034. 256, MDC008430. 332, MDC010058. 302, MDC010472. 239, MDC011946. 319, MDC015050. 276, MDC017644. 159, MDC020608. 143, MDC023006. 33, MDC024416. 57, MDC029091. 9, MDC029352. 13, MDC029352. 33	APETALA2 类似蛋白	转录因子
miR395	MDC003846. 249, MDC003846. 250, MDC003846. 250, MDC010785. 280, MDC003768. 152	ATP 硫酸化酶 镁离子螯合酶 泛素结合蛋白	转录因子 代谢
miR396	MDC003523. 387, MDC012167. 224, MDC016069. 205, MDC017731. 273, MDC011181. 611, MDC012167. 224	GAMYB 结合蛋白 热休克蛋白 ATP 依赖的 RNA 解旋酶 细胞色素氧化酶	转录因子 逆境诱导 代谢
miR403	MDC002523. 549, MDC013737. 148	AGO2 F-box	miRNA 结合 转录因子

但这些 miRNA 在苹果中的作用仍不明确,需进行试验验证。

### 2.3 *MdAGO1* 基因及发育相关 miRNA 的组织特异性分析

分别取 2  $\mu\text{L}$  苹果‘金冠’叶片、花和果实的总 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳检测(图 4),发现 28 S 与 18 S rRNA 条带清晰,亮度比例合适,说明提取的 RNA 质量较好,无明显降解。经微量紫外分光光度计测定,样品在 260 nm 处有最大吸收峰,浓度在 500 ng/ $\mu\text{L}$  左右,  $\text{OD}_{260\text{ nm}}/\text{OD}_{280\text{ nm}}$  和  $\text{OD}_{260\text{ nm}}/\text{OD}_{230\text{ nm}}$  均在 1.7~2.0 之间,说明所提 RNA 纯度较高,无杂蛋白和酚类物质干扰,可以用于下一步的

荧光定量 PCR 分析。



图 4 ‘金冠’苹果不同组织中的总 RNA 提取结果

Fig. 4 Total RNA extracted from different tissues of apple

荧光定量 PCR 检测苹果中克隆得到的 13 种发育相关 miRNA 和 *MdAGO1* 在不同组织中的表达量,结果如图 5 所示,*MdAGO1* 在花中表达量最高,

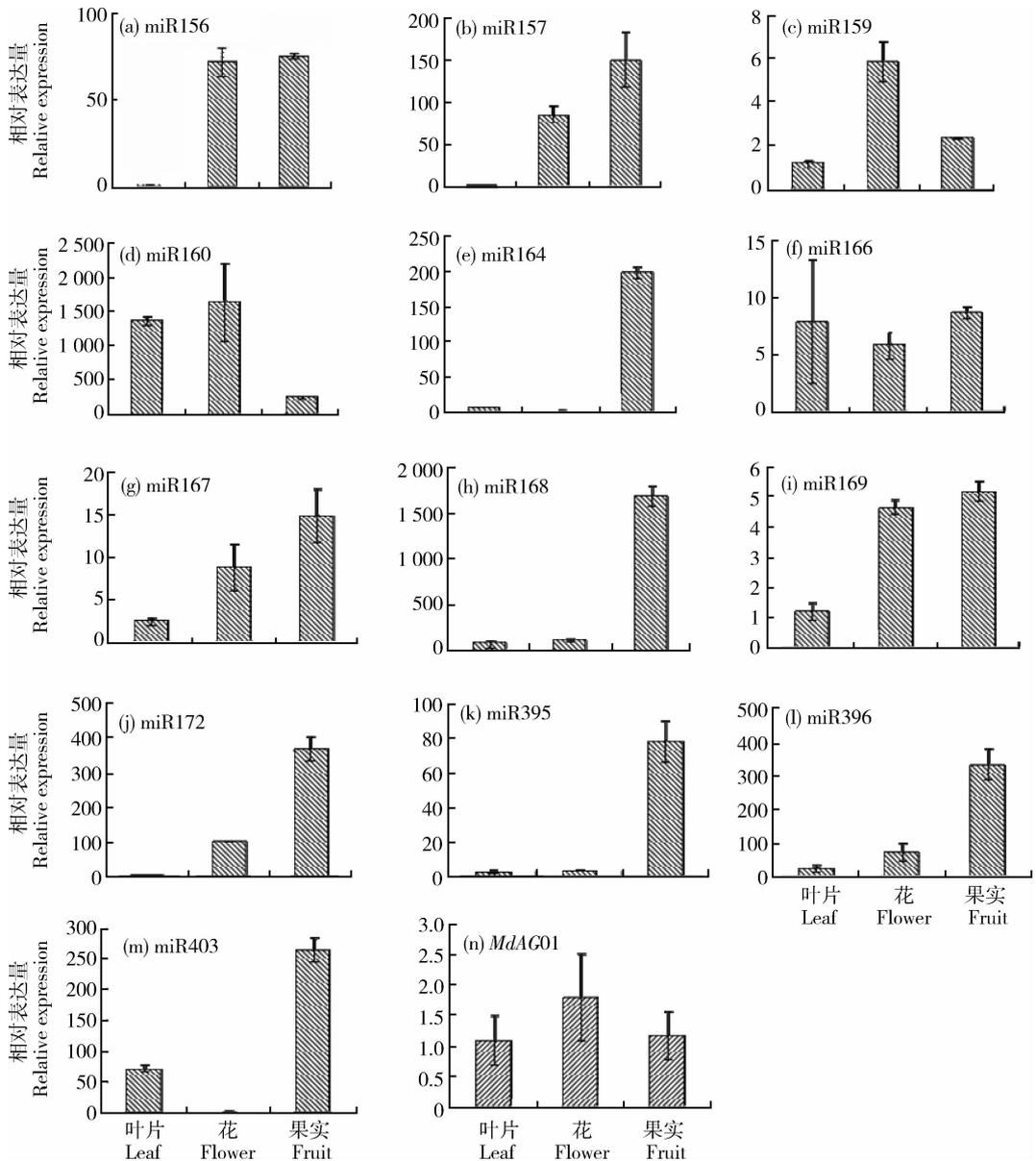


图 5 *MdAGO1* 和 miRNA 在不同组织器官中的表达分析

Fig. 5 Expression analysis of *MdAGO1* and miRNA in different tissues

果实次之,叶片表达量最低。多数 miRNA 在各组织中都有定量表达,但差异较大。其中 miR159、miR160、miR166、miR167、miR168、miR169 和 miR396 在各组织中都有较高的表达,暗示它们可能对苹果的叶、花和果实发育同样起调控作用,如 miR160 在花、叶片和果实中表达都较高,这可能与调控开花和叶片形态建成的特点有关。miR160、miR166 和 miR167 在叶片中表达较高,miR156、miR159、miR160 和 miR169 在花中表达量相对较高,miR156、miR157、miR167、miR168、miR395 和 miR403 等在苹果果实中表达量较高。miR156、miR157、miR159、miR169 和 miR172 在叶片中的表达量明显低于花,这些 miRNA 可能主要参与花的发育调控。在花和果实中多数 miRNA 的表达量相差不大,但是 miR164、miR168、miR172、miR396 和 miR403 在果实中的表达量明显高于花和果实,推测这些 miRNA 可能参与果实的发育和成熟。

综合分析图 5 发现,除 miR160 果实表达量低于叶片外,其余 miRNA 叶片表达量明显低于花和果实;*MdAGO1* 在花和果实中的表达量高于叶片,*MdAGO1* 与 miRNA 表达呈正相关关系。

### 3 讨论

尽管目前关于植物 miRNA 的研究不断获得突破,但大多研究集中在拟南芥等模式植物上,苹果等果树中研究较少,且主要集中在特定 miRNA 的定量分析方面,对于 miRNA 在果树中如何发挥作用报道较少,同时,在 miRNA 沉默通路中发挥重要作用的 *AGO1* 基因在苹果等蔷薇科果树中未见相关报道。本研究中,综合运用生物信息学和分子生物学方法克隆获得了苹果 *MdAGO1* 基因,并对 *MdAGO1* 蛋白进行分离鉴定和相关功能初步研究,为进一步全面深入研究其调控机制奠定了基础。

在植物中,miRNA 在植物不同部位和不同发育阶段均发现具有转录后调控功能,在植物发育过程中发挥重要作用,对 13 种 miRNA 进行表达分析,发现它们存在明显的组织表达差异,除在结果中提到的某些 miRNA 在特定组织中表达量远高于其他组织中外,综合分析图 5 可看出,13 种 miRNA 在叶片表达量较低,而在果实和花中表达量均较高,多数 miRNA 都有一定的表达量;而 *MdAGO1* 在花和果实中的表达量高于叶片,表明 *MdAGO1* 和 miRNA 可能共同调控植物生长发育。成熟果实中

糖酸、酚类等物质的变化非常复杂,与很多生理过程相关,需要多种 miRNA 共同调控,这可能也是 miRNA 总体表达量较高的原因之一。

目前 miRNA 在植物生长发育方面,调控植株形态建成和花发育研究的较为深入。研究发现,过量表达 miRNA 在不同植物中结果可能略有不同,如在水稻和玉米中过表达 miR156 会使植株矮小、分蘖增加等;但在拟南芥中过表达 miR156 的植株却得到了不同的结果,叶柄变长且叶片直径变小<sup>[20-22]</sup>,miR156 在苹果中的作用仍不明确,其在苹果生长发育方面的作用还需要进一步研究。

本研究初步分析了苹果 *AGO1* 基因和 miRNA 的表达模式,为苹果 *AGO1* 功能的研究奠定基础;同时,该研究也有助于苹果 miRNA 的筛选,利用基因工程的方法对苹果进行基因改良以缩短童期、提高果实品质等,为培育苹果新品种提供技术和理论支撑。

### 参 考 文 献

- [1] Megha G, Phillip D Z. Small silencing RNAs: An expanding universe[J]. *Nature*, 2009, 10: 94-108
- [2] 李超,杜志游,陈集双. 解读 AGO 蛋白结构及其功能[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2009, 25(11): 969-976
- [3] Vaucheret H. Plant argonautes[J]. *Trends Plant Sci*, 2008, 13(7): 350-358
- [4] Zhu J K. Reconstituting plant miRNA biogenesis[J]. *PNAS*, 2008, 105(7): 9851-9852
- [5] Chen X M. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* flower development[J]. *Science*, 2004, 303(5666): 2022-2025
- [6] Wang J W, Czech B, Weigel D. miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Cell*, 2009, 138: 738-749
- [7] Pulido A, Laufs P. Co-ordination of developmental processes by small RNAs during leaf development[J]. *J Exp Bot*, 2010, 61: 1277-1291
- [8] Bartel D P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297
- [9] Palatnik J F, Allen E, Wu X, et al. Control of leaf morphogenesis by microRNA[J]. *Nature*, 2003, 425: 257-263
- [10] 胥猛,谢雯凡,潘惠新,等. 杨树 ARGONAUTE 基因的克隆及序列分析[J]. *林业科学*, 2011, 47(3): 46-51
- [11] Kasai A, Kanehira A, Harada T. miR172 can move long distances in *Nicotiana benthamiana* [J]. *The Open Plant Science Journal*, 2010, 4: 1-6
- [12] Martin A, Adam H, Diaz-Mendoza M, et al. Graft-transmissible

- induction of potato tuberization by the microRNA miR172[J]. *Development*, 2009, 136(17): 2873-2881
- [13] Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, et al. The genome of the domesticated apple (*Malus × Domestica* Borkh) [J]. *Nature Genetics*, 2010, 42: 833-839
- [14] Chen C, Ridzon D A, Broomer A J, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(20): e179
- [15] FenG J L, Wang K, Liu X, et al. The quantification of tomato microRNAs response to viral infection by stem-loop real-time RT-PCR[J]. *Gene*, 2009, 437(1/2): 14-21
- [16] Livak K J, SchmittGen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method[J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408
- [17] Kiu H C, Sang E J, Young K L, et al. Developmental processes of leaf morphogenesis in *Arabidopsis*[J]. *J Plant Biol*, 2007, 50: 282-299
- [18] Achard P, Herr A, Baulxombe D C, et al. Modulation of floral development by a gibberellins-regulated microRNA [J]. *Development*, 2004, 131(14): 3357-3365
- [19] Baker C C, Sibber P, Wellmer F, et al. The early extra petals1 mutant uncovers a role for microRNA miR164c in regulating petal number in *Arabidopsis*[J]. *Curr Biol*, 2005, 15(4): 303-315
- [20] Xie K, Wu C, Xiong L. Genomic organization, differential expression, and interaction of SQUAMOSA promoter-binding-like transcription factors and microRNA156 in rice[J]. *Plant Physiol*, 2006, 142(1): 280-293
- [21] Wu G, Poethig R S. Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3[J]. *Development*, 2006, 133(18): 3539-3547
- [22] Chuck G, Cigan A M, Saeteurn K, et al. The heterochronic maize mutant *corngrass1* results from overexpression of a tandem microRNA[J]. *Nat Genet*, 2007, 39(4): 544-549

责任编辑: 王燕华