

· 基础研究 ·

基于生物信息学方法预测野葛中的 miRNA 及其靶基因[△]姚怡玮¹, 徐静², 杨萌¹, 李燕呢¹, 何美军³, 郭坤元³, 吴斌^{1*}

1. 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室/中国医学科学院

北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193;

2. 北京市海淀区植物组织培养技术实验室, 北京 100091;

3. 湖北省农业科学院 中药材研究所, 湖北 恩施 445000

[摘要] 目的: 基于 GitHub 上释放的野葛转录组序列和 miRBase 中的 microRNAs(miRNA)数据, 通过生物信息学方法预测野葛中保守的 miRNA, 为研究其在野葛中的生物学作用奠定基础。方法: 根据 miRNA 在植物中的保守性, 利用 psRobot 软件的前体预测模块“psRobot-mir”将 miRBase 数据库中已知的 miRNA 序列与野葛转录组序列进行比对, 按照 miRNA 的判定标准进行筛选, 并随机选取了 7 条 miRNA 进行茎-环 PCR 验证, 随后利用 psRNATarget 软件对这些 miRNA 进行了靶基因预测。结果: 在野葛中共预测出 34 条潜在的 miRNA 序列, 它们属于 18 个基因家族, miRNA 茎-环 PCR 验证的成功率是 100%。基于罚分 ≤ 3 , 预测出 235 个靶基因, 其中 66 个具有明确的功能, 涉及野葛抗病、生长发育、转录调节、胁迫应答等, 其中 28 个为抗病蛋白。结论: 预测出的野葛保守 miRNA 及其靶基因, 为今后解析 miRNA 在野葛抗病和次生代谢产物合成中的作用奠定了基础。

[关键词] 野葛; 生物信息学; microRNA; 靶基因

[中图分类号] R284.1; Q7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)04-0429-09

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20180904005

Prediction of miRNA and Its Target Genes in *Pueraria lobata* by BioinformaticsYAO Yi-wei¹, XU Jing², YANG Meng¹, LI Yan-ni¹, HE Mei-jun³, GUO Kun-yuan³, WU Bin^{1*}

1. Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine,

Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences/

Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

2. Plant Tissue Culture Technology Laboratory, Haidian District, Beijing 100091, China

3. Institute of Chinese Medicinal Materials, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Enshi 445000, China

[Abstract] **Objective:** We downloaded the transcriptome data released on GitHub and the microRNAs data from miRBase. Then these data were used to predict conserved microRNAs in *Pueraria lobata* by bioinformatics, which laid the foundation for further study of the biological function of miRNAs in *P. lobata*. **Methods:** Based on the conservation of miRNAs, the predicted precursor module “psRobot-mir” of the psRobot software was used to compare the known miRNA in miRBase database with *P. lobata* transcriptome data. And seven miRNAs were randomly selected for stem-loop PCR validation. Subsequently, we used psRNATarget software to predict target genes for these miRNA. **Results:** According to the criterion of miRNA, we predicted 34 miRNAs candidate in *P. lobata*, which belonged to 18 gene families. The validation rate of miRNA by stem-loop PCR is 100%. In total, using penalty score ≤ 3 , we predicted 235 target genes in which 66 genes encode proteins involving in the growth and development, transcriptional regulation, and stress response etc. Interestingly, 28 target genes encode disease-resistant proteins. **Conclusion:** The predicted miRNAs and its target genes laid the foundation for the future analysis the role of miRNAs in disease-resistance and the secondary metabolites synthesis in *P. lobata*.

[Keywords] *Pueraria lobata*(Willd.) Ohwi.; bioinformatics; target genes; microRNA

[△] [基金项目] 国家自然科学基金(81274015); 恩施州科技计划研究与开发项目(XYJ2016000305)

* [通信作者] 吴斌, 副研究员, 研究方向: 药用植物分子生物学; Tel: (010)57833201, E-mail: bwu@implad.ac.cn

野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi. 为豆科 Leguminosae 葛属 *Pueraria* 多年生木质藤本植物, 是一种大宗重要中药材, 于2002年被国家卫生部认定为药食两用植物。野葛以其干燥根入药, 称为葛根^[1], 具有提高大脑记忆能力、改善和治疗心脑血管疾病、抗肿瘤、保肝、消炎镇痛等功效^[2-3], 其主要生物活性成分为异黄酮类物质^[4]。此外, 野葛还富含淀粉、膳食纤维以及人体必需的多种氨基酸、矿物质和微量元素, 在保健品开发方面具有不错的市场前景。近些年大量研究者对于野葛的化学成分^[5]、药理作用^[6]、代谢途径解析及关键酶基因^[7]方面进行了研究。

microRNA (miRNA) 是一类由内源基因产生的、长度约为20~24 nt的非编码RNA。在植物中, miRNA通常来自于含有茎-环结构的初级转录物(pre-miRNA), 接着在Dicer等一系列酶的作用下产生成熟的miRNA^[8-9]。miRNA主要通过切割靶基因或者抑制其翻译在转录后水平调节基因表达, 从而在植物组织形态建成^[10]、抗病^[11]、非生物胁迫^[11]、次生代谢产物合成^[12]等方面起到了重要作用。然而迄今, 在野葛上未见报道。

由于植物中miRNA在序列上具有高度保守性^[13], 除了高通量测序结合计算机分析鉴定^[14], 也可以利用生物信息学方法预测其保守miRNA^[15]。即从miRBase下载已知的miRNA, 将其与所研究的物种转录组数据比对, 然后将比对上的转录本进行二级结构折叠, 再根据miRNA的判定标准进行筛选, 该方法被广泛用于植物miRNA的鉴定^[16-17], 在一些药用植物, 比如毛地黄^[18]、甘草^[19]、黄芪^[20]中有过报道。本研究首次预测了野葛中保守miRNA及其靶基因, 为今后解析miRNA在野葛防御反应、次生代谢产物合成等方面的作用奠定了基础。

1 材料

于湖北省恩施州华中药植物园试验基地采集2年生野葛 *P. lobata* 的根、茎和叶, 冻于液氮中, 然后保存在-80℃冰箱用于RNA的提取。

2 方法

2.1 已知植物miRNA序列的获得

从miRBase (<http://www.mirbase.org/>) 中下载全部miRNA序列(版本22), 作为预测野葛中保守

miRNA的参考序列。

2.2 野葛转录组数据及注释文件的获得

从GitHub (https://github.com/rongchunhan/Pueraria_lobata/commits/master/Pueraria_lobata_contigs.fa) 下载野葛的转录组序列和注释信息, 该序列是Han等测得^[6], 由不同组织(叶、茎、幼嫩根、成熟根、根维管束)的测序数据混合拼接得来。

2.3 野葛miRNA的生物信息学预测

利用psRobot软件^[21]的前体预测模块“psRobot-mir”, 将上述miRNA序列与转录组拼接数据进行比对, 采用默认参数, 输入文件格式均为fasta格式。psRobot内置mfold 3.5软件(<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/rna/form1.cgi>)能够预测并给出候选miRNA前体的二级结构和成熟的miRNA序列^[22]。接着对候选的miRNA进行人工核实, 参考Meyers等判定miRNA的标准^[23], 略作修改, 具体如下: 1) 预测的野葛miRNA前体能够折叠成发夹状的二级结构; 2) 成熟的miRNA与另一条臂上的互补序列不超过5个碱基的错配; 3) miRNA与另一条臂上的互补序列不超过3个bug; 4) 当两条以上的miRNA序列同时比对上同一前体时, 本研究以miRBase中大豆 *Glycine max* 或者苜蓿 *Medicago truncatula* 同家族miRNA的序列作为参照。

2.4 茎-环PCR验证miRNA的真实性

用天根公司多糖多酚植物miRNA提取分离试剂盒(DP504)提取植物总RNA, 具体操作参照说明书进行。提取野葛幼苗根的总RNA, 并使用Nano Drop™2000分光光度计和1.2%琼脂糖凝胶电泳检测RNA的浓度、纯度和完整性。

miRNA的检测采用茎-环PCR法。随机选取7条miRNA, 分别设计反转录茎-环引物及PCR引物(见表1), 利用荧光定量PCR法验证miRNA的真实性。

2.4.1 第一链反转录 首先配制无RNA混合物, 将4 μL 2.5 mmol·L⁻¹ dNTP、7.75 μL ddH₂O、1 μL RT引物(1 μmol·L⁻¹) 在65℃放置5 min, 接着迅速冰置2 min, 接着添加4 μL 5x First-Strand 缓冲液, 2 μL 0.1 mol·L⁻¹ DTT, 0.25 μL M-MLV (200单位/μL), 1 μL RNA模板, 然后执行反转录程序: 16℃ 30 min, 60个循环的30℃ 30 s, 42℃ 30 s, 50℃ 1 s, 75℃ 5 min, 反转录产物作为荧光定量PCR的模板。

表 1 miRNA 反转录茎-环引物及 PCR 引物

miRNA 名称	miRNA 序列(5'-3')	反转录引物(5'-3')	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
miR156c-5p	UUGACAGAAGAGAGUG-AGCACA	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAG-GTATTCGCACTGGATACTGTGCTC	CGGCGGTGACAGA-AGAGAGT	CAGTGCAGGGTCCGAG-GTAT
miR166-5p	GGAAUGUUGUUUGGCU-CGAGG	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAG-GTATTCGCACTGGATACTTCAG	GGCGGGAATGTTG-TTTGGC	CAGTGCAGGGTCCGAG-GTAT
miR167-5p	UGAAGCUGCCAGCAUG-AUCUC	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAG-GTATTCGCACTGGATACCAGATCA	GGCGGTGAAGCTGC-CAGCA	CAGTGCAGGGTCCGAG-GTAT
miR168-3p	CCGCGCUUGCAUCAAC-UGAAU	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAG-GTATTCGCACTGGATACTTCAG	CGGCCCCGCCTTGC-ATCAA	CAGTGCAGGGTCCGAG-GTAT
miR396b-5p	UUCCACAGCUUUCUUG-AACUU	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAG-GTATTCGCACTGGATACAAGTTC	CGGCGGTTCACAC-GCTTTCTT	CAGTGCAGGGTCCGAG-GTAT
miR1507-3p	UCUCAUCCAUACAUC-GUCUGA	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAG-GTATTCGCACTGGATACTCAGACG	CGGCGGTCTCATTC-CATACAT	CAGTGCAGGGTCCGAG-GTAT
miR2089a/b-3p	UUACCUAUUCCACCAA-UUCCAU	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAG-GTATTCGCACTGGATACATGAA	GGCGGTACCTATT-CCACCAA	CAGTGCAGGGTCCGAG-GTAT

2.4.2 荧光定量 PCR 在 PCR 管中加入: 10 μL 2x SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa, Japan), 1 μL 通用反向引物($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 1 μL miRNA 特异的正向引物($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 1 μL 上述反转录产物, 7 μL H_2O 。使用 Bio-Rad CFX96 实时 PCR 系统 C1000 热循环仪 (Bio-Rad, USA) 进行扩增。程序如下: 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 45 个循环 94 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 6 s。

2.5 野葛 miRNA 的靶基因预测

使用在线软件 psRNATarget^[24], 采用默认参数对野葛 miRNA 的靶基因进行预测, 通过罚分机制筛选潜在靶基因, 规则为: U 与 G 配对罚 0.5 分, 其他

不匹配罚 1 分; 小于 3 个碱基插入或缺失罚 2 分, 3 个碱基及以上罚 3 分。为了保证靶基因的真实性, 本研究选择罚分 ≤ 3 的结果作为 miRNA 的潜在靶基因。

3 结果与分析

3.1 野葛 miRNA 预测结果及其二级结构

使用 psRobot 软件“psRobot-mir”模块共筛选出 27 条候选 miRNA 前体, 手工核实发现符合标准的共有 25 条, 其中有 9 条前体产生 2 条 miRNA, 其余分别产生 1 条 miRNA。最终在野葛中共预测出 34 条 miRNA, 它们属于 18 个家族。这些 miRNA 的长度范围为 19 ~ 24 bp, 见表 2。

表 2 野葛中预测的 miRNA

miRNA 名称	miRNA 序列	基因 ID、位置及正负链	MFEI *	前体长度
miR156a-5p	UGACAGAAGAGAGUGAGCACA	Contig51543 147 279 +	1.04	133
miR156a-3p	GCUCACUUCUCUUCUGUCAGC	Contig51543 147 279 +	1.04	133
miR156b-5p	UGACAGAAGAGAGAGAGCACA	Contig21082 503 605 +	0.64	103
miR156c-5p	UUGACAGAAGAGAGUGAGCACA	Contig15803 1 102 +	1.20	102
miR159-5p	GAGCUCCUUGAAGUCCAAUUG	Contig18342 962 1174 -	1.02	213
miR159-3p	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA	Contig18342 962 1174 -	1.02	213
miR162a-5p	UGGAGGCAGCGGUUCAUCGAUC	Contig04628 1952 2074 -	0.84	123
miR162a-3p	UCGAUAAACCUCUGCAUCCAG	Contig04628 1952 2074 -	0.84	123
miR162b-3p	AUCGAUGAACCGCUGCCUCC	Contig04628 1952 2074 +	0.85	123

续表 2

miRNA 名称	miRNA 序列	基因 ID、位置及正负链	MFEI *	前体长度
miR166-5p	GGA AUGUUGUUUGGCU CGAGG	Contig77924 139 341 +	0.98	203
miR166-3p	UCG GACCAGGCUUCAU UCCCG	Contig77924 139 341 +	0.98	203
miR167-5p	UGA AGCUGCCAGCAUGAUCUG	Contig21707 299 391 +	1.13	93
miR168-5p	UCG CUUGGUGCAGGUCGGGAA	Contig34779 475 587 -	0.82	113
miR168-3p	CCCCCCUUGCAUCAACUGAAU	Contig34779 475 587 -	0.82	113
miR169a-5p	CAGCCAAGGGUGAUUUGCCGG	Contig66165 169 311 -	1.17	143
miR169a-3p	UGCCGGCAAGUUUCUCUUGGC	Contig66165 169 311 -	1.17	143
miR169b-5p	CAGCCAAGGAUGACUUGCCGG	Contig76759 40 202 +	0.95	163
miR169b-3p	GGCAAGUUGUUCUUGGCUACA	Contig76759 40 202 +	0.95	163
miR171a-3p	UGAUUGAGCCGCGCCAAUAUC	Contig80245 379 501 -	0.85	123
miR171b-3p	UGAUUGAGCCGUGCCAAUAUC	Contig56067 96 198 +	1.07	103
miR172-3p	AGAAUCUUGAUGAUGCUGCAU	Contig27456 590 742 +	0.93	153
miR396a-5p	UUCCACAGCUUUCUUGAACUG	Contig30485 49 191 +	1.00	143
miR396a-3p	GUUCAAUAAAGCUGUGGGAAG	Contig30485 49 191 +	1.00	143
miR396b-5p	UUCCACAGCUUUCUUGAACUU	Contig47044 232 364 -	0.89	133
miR396b-3p	AAGAAAGCUGUGGGAGAAUAUGGC	Contig47044 232 364 -	0.89	133
miR396c-3p	GUUCAAGAAAGCUGUGGAAGA	Contig30485 47 189 -	0.88	143
miR1507-3p	UCUCAUCCAUAACAUCGUCUGA	Contig26507 253 395 +	0.98	143
miR1509-5p	UUAAUCAAGGAAAUACGGUU	Contig21250 20 162 +	1.00	143
miR1514-5p	UUCAUUUUUAAAAUAGGCAUU	Contig61985 152 281 +	0.87	128
miR2089a-3p	UUACCAUAUCCACCAAUCCAU	Contig19998 1351 1463 -	1.19	113
miR2089b-3p	UUACCAUAUCCACCAAUCCAU	Contig19999 351 483 -	0.92	133
miR2109-5p	UGCGAGUGUCUUCGCCUCUG	Contig53853 439 551 -	0.93	113
miR10191-5p	GGCGACUGCGGCUCUCCGCCG	Contig79226 354 426 +	0.92	73
miR9749-3p	UUAGCUUCUUUACCUUCCCC	Contig17326 186 308 -	1.23	123

注：* 表示最小自由能折叠指数。

通常情况下，植物 miRNA 前体在长度和二级结构上存在多样性^[25]。在筛选过程中，笔者发现预测的野葛 miRNA 前体的长度变化相对较大，在 90 ~ 203 bp；虽然其前体的长度和二级结构变化较大，但都能折叠成茎-环结构(见图 1)。

预测出的 25 条野葛 miRNA 前体的 MFEI 值范围为 0.64 ~ 1.20，平均为 0.97(见表 2)，其中大多数符合 miRNA 前体二级结构稳定性要求(MFEI 大于 0.8)^[26]。

3.2 野葛 miRNA 真实性验证

为了验证预测的 miRNA 真实性，本研究随机选取 7 条 miRNA，通过茎-环实时荧光定量 PCR 进行实验验证。结果显示这 7 条 miRNA 荧光定量 PCR 扩增产物的熔解曲线均为单峰。随后进行琼脂糖凝胶电泳，均出现明显单一条带，大小约为 60 bp(见图 2)，与预期茎-环 PCR 扩增的大小相一致，从而验证这些 miRNA 的真实性。

续表 3

小 RNA 家族	靶基因 ID(罚分)	功能	分类
miR162	Contig16227(3)	RNA 结合蛋白	RNA 加工
	Contig04750(3)	翻译起始因子 IF-3	翻译
	Contig07986(3)	DCL1	转录调节
	Contig31567(3)	喹诺酮耐药蛋白运转蛋白 norA	物质运输
miR166	Contig15423(2.5)	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶	蛋白激酶
	Contig41616(2.5)	受体样蛋白激酶	蛋白激酶
miR167	Contig10153(3)	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶	蛋白激酶
	Contig10527(2.5)	2-氧代酸脱氢酶	物质代谢
	Contig13644(3)	半乳糖变位酶	物质代谢
	Contig17706(3)	DNA 结合家族蛋白	转录加工
miR169	Contig39023(2.5)	赤霉素 20-氧化酶	物质代谢
	Contig00113(3)	Rj2 蛋白	抗病性
	Contig21226(2.5)	Tau 类谷胱甘肽 S-转移酶	防御反应
	Contig21230(2.5)	Tau 类谷胱甘肽 S-转移酶	防御反应
miR172	Contig08597(2)	CCAAT 结合转录因子家族蛋白	转录加工
	Contig20774(2.5)	大豆磷酸转运蛋白 11	运输蛋白
	Contig11481(3)	RNA 指导的 DNA 聚合酶	转录加工
	Contig06829(2.5)	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶	蛋白激酶
miR396	Contig30028(2.5)	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶	蛋白激酶
	Contig60777(3)	受体样蛋白激酶	蛋白激酶
	Contig15736(3)	富含亮氨酸的重复跨膜蛋白激酶	抗病性
	Contig18872(2)	Neurobeachin 样蛋白	信号转导
miR1507	Contig29442(3)	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶	蛋白激酶
	Contig37435(3)	Ty3 / 吉普赛逆转录转座子蛋白	转录加工
	Contig14463(2.5)	丝氨酸羟甲基转移酶	物质代谢
	Contig30920(3)	PIF3	转录因子
miR1509	Contig32571(3)	抗病蛋白	抗病性
	Contig33172(2.5)	含有 NBS 的抗性蛋白质	抗病性
	Contig38255(3)	抗病蛋白 SB4	抗病性
	Contig06069(3)	抗性蛋白	抗病性
miR1514	Contig48165(2.5)	DNA 聚合酶	DNA 加工
	Contig38034(3)	含有五肽重复的蛋白质	抗病性
	Contig45546(3)	Aladin	功能不明确
	Contig06306(3)	BZIP 转录因子 bZIP96	转录因子
miR2089	Contig30755(3)	MscS 家族内膜蛋白 ynaI	泡膜运输
	Contig49125(3)	含有五肽重复的蛋白质	抗病性
	Contig16085(2.5)	丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶	物质代谢
	Contig21738(1)	抗病蛋白质	抗病性
	Contig17187(2.5)	抗性蛋白 KR1	抗病性
	Contig02965(3)	H ⁺ 运输两个扇区的 ATP 酶	物质运输

续表 3

小 RNA 家族	靶基因 ID(罚分)	功能	分类
	Contig24918(2.5)	抗性蛋白	抗病性
	Contig19043(3)	Rj2 蛋白	抗病性
	Contig61463(2.5)	SEO-F1 蛋白	通道蛋白
	Contig07262(3)	TIR-NBS-LRR 型抗病蛋白	抗病性
	Contig07967(3)	TIR-NBS-LRR 型抗病蛋白	抗病性
	Contig23961(3)	TIR-NBS-LRR 型抗病蛋白	抗病性
	Contig15138(2.5)	TMV 抗性蛋白 N	抗病性
	Contig18851(2.5)	TMV 抗性蛋白 N	抗病性
	Contig28942(2.5)	TMV 抗性蛋白 N	抗病性
	Contig48059(2.5)	TMV 抗性蛋白 N	抗病性
	miR2109		
	Contig79793(2)	含有 NBS 的抗性蛋白质	抗病性
	Contig11047(2.5)	含有 NBS 的抗性蛋白质	抗病性
	Contig35676(2.5)	抗性蛋白	抗病性
	Contig22760(3)	TIR-NBS-LRR 型抗病蛋白	抗病性
	miR9749		
	Contig29677(2)	有丝分裂细胞周期蛋白 b1 型	细胞分裂
	Contig40035(2.5)	含有五肽重复的蛋白质	抗病性
	Contig11995(3)	Reticulon 样蛋白	膜蛋白
	Contig47402(3)	含有五肽重复的蛋白质	抗病性
	Contig38936(3)	Rpp4C5	抗病性
	Contig18977(3)	CHUP1 蛋白	叶绿体运输蛋白

4 讨论

本研究在野葛中共鉴定出 34 条保守 miRNA，预测出 66 个具有明确功能的靶基因，其中 28 个为抗病蛋白。在植物抗病防御中，具有核苷酸结合位点(NBS)的抗病基因被用于植物抗病基因识别和分类^[33]。本研究预测到野葛的大部分抗病基因也包含这个特征。在野葛同科植物大豆中有报道 miRNA 负调控 NBS 抗病基因。在最近的研究中，哈达等在研究大豆花叶病毒病(SMV)时发现 SMV 可以通过诱导大豆中 miR1507a、miR1507c、miR482a、miR168a 和 miR1515a 的积累，下调 NBS-LRR 家族抗性基因来抑制大豆的防御反应。在抑制上述 5 个 miRNA 表达后，SMV 在大豆中的感染率有明显下降^[32]。在野葛中，miR1507-3p 被发现是与大豆 miR1507a 相同的保守 miRNA，且其被预测的靶基因均为抗病相关基因。而在豆科植物苜蓿中，Zhai 等^[34]发现 miRNA 通过产生反式作用干扰小 RAN (siRNA) 负调控 NB-LRR 基因。这些结果为揭示野葛抗病的分子机制奠定了基础。

还有研究表明，食物中的外源植物 miRNA 可以调节哺乳动物中靶基因的表达：在稻米中发现含量丰富的 168a，被人食用后能够减缓低密度脂蛋白从血浆中清除的速度，从而使食用者更易得高血脂、糖尿病等代谢疾病^[35]。本研究在野葛中发现 miR1514 靶向 Aladin 蛋白质。目前已知编码该蛋白的 AAAS 基因突变是导致三 A 综合征的原因^[36]。这一发现也暗示了 miRNA 可以跨界行使功能。

在世界范围内，野葛主要分布于东亚及东南亚地区；在我国除青海、西藏等少数几个省、自治区外，大部分省、自治区都有分布^[37-38]。近年来随着野葛需求量越来越大，现有的野生种质资源可能难以满足日益增长的需求。解析野葛抗病的分子机制一方面有利于野葛栽培，提高其产量和品质；另一方面，野葛主要活性成分为异黄酮类、萜类、生物碱类等次生代谢产物。植物次生代谢及其调控是植物生长或进化过程中出现的对外界环境改变的适应，包括抵御一些环境胁迫和病虫害。本研究预测得到的 miRNA 的靶基因中以抗病基因居多，关注野葛抗病基因为后续深入了解野葛 miRNA 的生物学功

能,特别是在次生代谢中的作用奠定基础。

本研究采用 psRobot 软件进行了 miRNA 预测;以前采用 BLAST 或者 soap 程序将 miRNA 和转录组序列进行比对,然后将比对上的转录组序列用二级结构预测软件进行折叠,再根据 miRNA 的标准进行筛选;相较于以前方法,本操作更加快捷、方便,psRobot 内置二级结构折叠软件 mfold3.5 在预测 miRNA 时可以同时输出前体二级结构折叠和成熟的 miRNA 序列。

随着高通量测序技术的发展,测序小 RNA 并结合生物信息学分析已经成为鉴定 miRNA 的主要手段。目前已经在红豆杉^[39]、人参^[40]等药用植物中得到应用。今后笔者将使用高通量测序野葛的小 RNA 数据,进一步预测其特异的 miRNA 和 siRNA,并进行实验验证,使结果更加丰富可靠,为深入研究野葛中小 RNA 的功能奠定基础。

参考文献

- [1] 陈士林,林余霖.中草药大典:上册[M].北京:军事医学科学出版社,2006:219.
- [2] 李昕,潘俊娴,陈士国,等.葛根化学成分及药理作用研究进展[J].中国食品学报,2017,17(9):189-195.
- [3] 董英,徐斌,林琳,等.葛根的化学成分研究[J].食品与机械,2005,21(6):85-88,100.
- [4] DU G,ZHAO H Y,ZHANG Q W,et al. A rapid method for simultaneous determination of 14 phenolic compounds in Radix Puerariae using microwave-assisted extraction and ultra high performance liquid chromatography coupled with diode array detection and time-of-flight mass spectrometry[J]. J Chromatogr A,2010,1217(5):705-714.
- [5] 潘玲玲,任江剑,江建铭.野葛葛根素积累动态的研究[J].中国现代中药,2011,13(9):15-17.
- [6] HAN R,TAKAHASHI H,NAKAMURA M,et al. Transcriptomic landscape of Pueraria lobata demonstrates potential for phytochemical study[J]. Front Plant Sci,2016(6):426.
- [7] WANG X,LI S,LI J,et al. De novo transcriptome sequencing in Pueraria lobata to identify putative genes involved in isoflavones biosynthesis[J]. Plant Cell Rep,2015,34(5):733-743.
- [8] BARTEL D P. Micro RNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell,2004,116(2):281-297.
- [9] REN G D,YU B. Critical roles of RNA-binding proteins in miRNA biogenesis in Arabidopsis[J]. RNA Biol,2012,9(12):1424-1428.
- [10] CHEN X M. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development[J]. Science,2004,303(5666):2022-2025.
- [11] 王冰,宋娜,孙燕飞,等. MicroRNA156 家族在小麦非生物胁迫中的表达分析[J]. 植物病理学报,2013,43(2):201-204.
- [12] 卢黎,高伟,黄璐琦. 药用植物 microRNA 与次生代谢产物的合成调控[J]. 中国中药杂志,2018,43(9):1806-1811.
- [13] ZHANG B,WANG Q,PAN X. MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants[J]. J Cell Physiol,2010,210(2):279-289.
- [14] GALLI V,GUZMAN F,DE OIFV,et al. Identifying MicroRNAs and Transcript Targets in Jatropha Seeds[J]. Plos One,2014,9(2):e83727.
- [15] ZHANG B H,PAN X P,WANG Q L,et al. Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis[J]. Cell Res,2005(15):336.
- [16] 蔡蕊,未晓巍,武慧,等. 植物 microRNA 的生物信息学预测与分析[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(3):565-570.
- [17] 杜江峰,武永军,方晓峰,等. 生物信息方法预测高粱 miRNA 及其靶基因[J]. 科学通报,2010,55(7):553-561.
- [18] WU B,YING L,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(1):15.
- [19] 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.
- [20] 韦春香,肖自华,黄曦,等. 黄芪 miRNA 的预测及其干旱表达模式分析[J]. 中草药,2017,48(1):155-164.
- [21] WU H J,MA Y K,CHEN T,et al. PsRobot: a web-based plant small RNA meta-analysis toolbox[J]. Nucleic Acids Res,2012,40:W22-W28.
- [22] ZUKER M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction[J]. Nucleic Acids Res,2003,31(13):3406-3415.
- [23] MEYERS B C,AXTELL M J,BARTEL B,et al. Criteria for Annotation of Plant MicroRNAs[J]. Plant Cell,2008,20(12):3186-3190.
- [24] DAI X B,ZHUANG Z H,ZHAO P X. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server(2017 release)[J]. Nucleic Acids Res,2011,39:W155.
- [25] ZHANG B H,PAN X P,ANDERSON T A. Identification of 188 conserved maize microRNAs and their targets[J]. Febs Lett,2006,580(15):3753-3762.

- [26] ZHANG B H, PAN X P, COX S B, et al. Evidence that miRNAs are different from other RNAs [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63(2): 246-254.
- [27] 李明, 李长生, 赵传志, 等. 植物 SPL 转录因子研究进展 [J]. *植物学报*, 2013, 48(1): 107-116.
- [28] 李微微, 李川, 罗彦忠, 等. 拟南芥 DCL1 启动子的分离及其表达特性分析 [J]. *中国农业科技导报*, 2010, 12(3): 98-102.
- [29] 陈晓慧, 白玉, 李汉生, 等. 龙眼 DCL 家族基因的启动子分析及时空表达 [J]. *西北植物学报*, 2017, 37(10): 1926-1933.
- [30] 陈惠英. 烟草 DCL 基因的抗病调控功能分析 [D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
- [31] BAO D, GANBAATAR O, CUI X, et al. Down-regulation of genes coding for core RNAi components and disease resistance proteins via corresponding microRNAs might be correlated with successful Soybean mosaic virus infection in soybean [J]. *Mol Plant Pathol*, 2018, 19(4): 948-960.
- [32] SZITTYA G, MOXON S, SANTOS D M, et al. High-throughput sequencing of *Medicago truncatula* short RNAs identifies eight new miRNA families [J]. *Bmc Genomics*, 2008, 9(1): 593.
- [33] 刘云飞, 万红建, 李志邈, 等. 植物 NBS-LRR 抗病基因的结构、功能、进化起源及其应用 [J]. *分子植物育种*, 2014, 12(2): 377-380, 384, 389.
- [34] ZHAI J X, JEONG D H, DE PAOLI E, et al. MicroRNAs as master regulators of the plant NB-LRR defense gene family via the production of phased, trans-acting siRNAs [J]. *Genes Dev*, 2011, 25(23): 2540-2553.
- [35] ZHANG L, HOU D, CHEN X, et al. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA [J]. *Cell Res*, 2012(22): 107.
- [36] CRONSHAW J M, MATUNIS M J. The nuclear pore complex protein ALADIN is mislocalized in triple A syndrome [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(10): 5823-5827.
- [37] 吴金平, 丁自立, 郭凤领, 等. 中国葛资源现状及发展对策 [J]. *湖北农业科学*, 2013, 52(24): 6084-6086.
- [38] 陈元生, 柳雪芳. 我国葛种质资源的研究与利用 [J]. *长江蔬菜*, 2008(11): 6-9.
- [39] 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): 37-44.
- [40] WU B, WANG M, MA Y, et al. High-Throughput Sequencing and Characterization of the Small RNA Transcriptome Reveal Features of Novel and Conserved Micro RNAs in *Panax ginseng* [J]. *Plos One*, 2012, 7(9): e44385.

(收稿日期: 2018-09-04 编辑: 王丽英)