* 学术论文*

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)miR396分子对类神经酰胺酶基因表达的负调控*

刘冬梅[1,2] 余迪求[1**]

1. 中国科学院西双版纳热带植物园，昆明 650223；2. 中国科学院研究生院，北京 100049

摘要 以拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)miR396小分子为研究对象，分别克隆到了miR396小分子的两个前体(*MIR396a*，*MIR396b*)，得到转基因植株后，通过Microarray分析、Northern杂交以及遗传学分析的方法探讨了miR396与拟南芥类神经酰胺酶基因的关系．对miR396高表达转基因植株进行Microarray分析的结果表明，拟南芥类神经酰胺酶基因(*Atceramidase-like1*，*Atceramidase-like2*)在miR396高表达转基因植株中的表达与空载体转基因植株相比下降2倍以上，而4-alpha-乳糖基神经酰胺半乳糖转移酶则增加2倍以上．Northern杂交结果进一步验证了Microarray分析的结果，即在miR396高表达转基因植株中，拟南芥类神经酰胺酶基因的成员*Atceramidase-like1*和*Atceramidase-like2*表达水平均显著降低(分别减少6.8倍和2倍以上)，而*Atceramidase-like3*的表达水平在*35S:MIR396a*转基因植株叶中有所下降，在*35S:MIR396b*转基因植株叶中变化不明显．相反地，在*35S:MIR396a*和*35S:MIR396b*转基因植株叶中，miR396表达水平分别比空载体转基因植株增加2倍以上．上述研究结果说明拟南芥miR396能有效地负调控*Ceramidase-like1*和*Ceramidase-like2*等基因的表达水平．

关键词 **miR396** **miR396**前体 神经酰胺酶基因 神经酰胺

MicroRNAs (miRNAs)是大小约21—23个碱基的小分子RNA，是由具有发夹结构的单链RNA前体(约70—90个碱基大小)经过Dicer酶加工后生成的[1,2]．miRNAs的一个共同特点，是它的序列存在于茎环结构的茎上[3]．这种茎环结构通常是由70多个核苷酸组成的环状结构和不完全的发夹结构构成．茎部形成双链RNA，但不是严格互补，可存在错配和GU摆动配对[4—6]．

有些研究证明，miRNA在调控植物的生长发育方面发挥着重要的生物学功能[7]．例如miR164可以调控拟南芥的侧根生长[8]；miR165调控叶的形态建成[9]；miR172参与调控拟南芥花的发育等[10]．另外，还发现一些miRNA在植物抗逆性方面可行使重要的功能[11—13]．所以miRNA作为一种新近发现的小分子RNA，在生物体生命活动过程中具有十分重要的分子生物学功能．但到目前为止，已明确靶基因及确定功能的miRNA为数不多．

目前一般采用遗传分析、直接克隆(direct cloning)和生物信息学预测(bioinformatic prediction)并经实验验证的方法克隆和发现miRNA[7,14]．

2008-06-05收稿，2008-07-11收修改稿

* 国家自然科学基金(批准号：90408022)、云南省自然科学基金(批准号：2004C0051M)和国家高科技研究发展计划(863计划)(批准号：2006AA02Z129)资助项目

** 通信作者，E-mail：ydq@xtbg.ac.cn

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Jones-Rhoades 等曾通过生物信息学方法从拟南芥和水稻中发现了92个 microRNA，其中包括 miR396[3]. 他们采用 PCR、Northern 杂交及5'-RACE等实验方法验证了 miR396 的存在和表达，即 miR396 基因在拟南芥中有两个位点，分别存在于2号染色体和5号染色体. 同时预测了 miR396 可能的靶基因为 *AtGrowth Regulation Factor (AtGRF)*，Rhodenase-like protein 和 Kinesin-like protein B，并通过5'-RACE 证实了部分 *AtGRF (AtGRF1, AtGRF2, AtGRF3, AtGRF7, AtGRF8, AtGRF9)* 是 miR396 的靶基因[3,7]. Zhang 等通过 EST 序列分析方法发现 miR396 在 15 个不同的物种中存在，是高度保守的小分子[15]. 尽管已有上述报道，但 miR396 详细的分子生物学功能还未见报道.

神经酰胺(ceramide)是最简单的鞘脂，与鞘氨醇(sphinganine)和 1-磷酸鞘氨醇(sphinganine-1-phosphate)等作为第二信使，能有效调控许多酶活性和靶蛋白的生物学功能[16,17]. 植物鞘脂类基因已经在酵母中被克隆、表达、并进行了功能分析[18—21]. 在高等植物中，1-磷酸鞘胺醇与其类似物在植物细胞信号转导途径中的功能已经开始被研究[22—24]. 干旱和脱落酸处理可以增加细胞内 1-磷酸鞘胺醇的浓度，进而促使保卫细胞闭合[22—24]；外源植物 1-磷酸鞘胺醇可以抑制光诱导的气孔开放，诱使开放的气孔关闭[25]. 拟南芥 1-磷酸鞘胺醇裂解酶(sphinganine-1-phosphate lyase, SPL)参与了拟南芥叶的发育和衰老过程. 在拟南芥叶的发育不同阶段呈现动态变化，即随着细胞的衰老，AtSPL 的浓度逐渐增加，在叶凋亡的最后一刻最高[26]. 这与 AtSPL 在拟南芥叶组织中调控 1-磷酸鞘氨醇相协调. 在正常生长条件下，拟南芥每克干重叶组织中 S1P 含量为 5—46 pg，而在干旱逆境条件下增加 1.3—2.4 倍[26]. 神经酰胺酶(ceramidase)是以神经酰胺为中心的脂代谢途径的重要组成部分，但是植物神经酰胺酶的功能目前还不清楚.

本文以拟南芥为实验材料，通过基因克隆的方法高表达 miR396 的两个前体，并结合 Microarray 分析，Northern 杂交和遗传学分析等方法发现 miR396 可能通过负调控拟南芥类神经酰胺酶基因来参与神经酰胺代谢途径的调控.

1 材料与方法

1.1 材料

选用拟南芥的生态型 Columbia 为实验材料. 种子表面灭菌后均匀散布在 1/2 MS 培养基(含 0.9% agar)，4 ℃春化2 d 后，转移到28 ℃培养箱培养 5—7 d 后移栽到土里.

1.2 质粒构建与农杆菌转化

包含 *MIR396a* 发夹结构的基因组序列(544bp)作为合成前体序列. 使用两个引物 (5'-TGCTGTAAAAGAATGACCCTT-3', 5'-AAACTCATAGACAGAAGTTAGGGTT-3') 进行 PCR(聚合酶链式反应)获得这个序列，然后克隆到 pUCm-T Vector (Sangon). 通过测序证实后再克隆到含 35S 启动子的高表达载体(pOCA30)上，标记为 35S::MIR396a. 通过相同方法获得 *35S: MIR396b*.

农杆菌转化按照 Clough 等的花浸染法操作[27].

1.3 Northern 杂交

RNA 提取采用 Trizol reagent (Invitrogen)法. 使用 1.5% 甲醛-MOPS 琼脂糖凝胶分离 RNA 后，转移到尼龙膜上. 杂交温度为 68 ℃；杂交液选用 PerfectHyb™ Plus buffer (Sigma-Aldrich). 探针通过 klenow fragment (Takara) 进行 ^{32}P-dATP 标记.

关于小分子 RNA 杂交，先将 20 μg 总 RNA 通过 15% 聚丙烯酰胺变性凝胶(含 7 mol/L 尿素)进行分离，然后转移到尼龙膜上. 杂交温度为 35 ℃；杂交液选用 PerfectHyb™ Plus buffer (Sigma-Aldrich). 探针选用 Terminal Deoxynucleotidy Transferase (Takara) 进行 ^{32}P-dATP 标记.

1.4 Affymetrix microarray 分析

野生型拟南芥与转基因植株在相同条件下生长 20 d 后，收集除去根部的植株材料. 通过 Trizol reagent (Invitrogen) 法提取的总 RNA 用来做基因芯片(ATH1, Affymetrix)的杂交分析.

2 结果与分析

2.1 miR396 及其前体在高表达转基因植株中表达量的检测

miR396 小分子是 Jones-Rhoades 等于 2004 年

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

通过生物信息学方法发现的，即*MIR396*基因在拟南芥中有两个位点，分别位于2号染色体和5号染色体[3]．通过PCR，Northern杂交及5'-RACE等实验技术，已证实miR396小分子的存在、表达水平和表达部位[3]．两个位点所编码的相应miR396小分子，即*miR396a*和*miR396b*，只有一个碱基的差别[3]．

为了研究miR396小分子的分子生物学功能，我们采用基因克隆和遗传操作技术分别构建miR396两个前体的拟南芥高表达质粒载体(*35S:MIR396a*，*35S:MIR396b*)，并通过农杆菌介导法转入拟南芥植株，通过筛选获得高表达转基因植株．当转基因植株生长约25d时，收集莲座叶提取总RNA，然后通过Northern杂交技术分别检测miR396分子及其前体在转基因植物中的表达水平．结果表明miR396小分子及其前体*MIR396a*和*MIR396b*在*35S:MIR396a*和*35S:MIR396b*转基因植株中的表达水平与空载体相比显著增加(图1)．

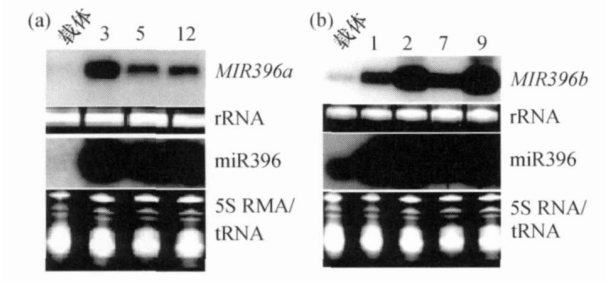

图1 miR396及其前体在载体、*35S::MIR396a*(a)3，5，12和(b)1，2，7，9转基因植株中的表达量

选用生长期为25d的拟南芥提取总RNA．20μg总RNA用于小分子杂交

2.2 Microarray结果表明拟南芥类神经酰胺酶基因下降

根据神经酰胺酶的最适pH值，分为酸性、中性和碱性神经酰胺酶[28]．拟南芥3个神经酰胺酶类似基因均为中性/碱性神经酰胺酶(表1)．Microarray结果显示*Atceramidase-like1*，*Atceramidase-like2*，*Atceramidase-like3*和碱性植物神经酰胺酶(alkaline phytoceramidase)等基因在转基因植株中的表达与野生型相比均下降，其中*Atceramidase-like1*，*Atceramidase-like2*和碱性植物神经酰胺酶基因下降2倍以上，而*Atceramidase-like3*的表达水平有所下降但不显著．同时发现4-alpha-乳糖神经酰胺半乳糖转移酶增加2倍以上(表2)，这表明神经酰胺在神经酰胺酶减少的情况下主要向鞘糖脂转化．

表1 拟南芥类神经酰胺酶基因家族的基本信息

名 称	基因位点	基因注释
CER1	At5G58980	中性/碱性非溶酶体神经酰胺酶1(Neutral/alkaline non-lysosomal ceramidase-like1)
CER2	At1G07380	中性/碱性非溶酶体神经酰胺酶2(Neutral/alkaline non-lysosomal ceramidase-like 2)
CER3	At2G38010	中性/碱性非溶酶体神经酰胺酶3(Neutral/alkaline non-lysosomal ceramidase-like 3)

表2 转基因植株中碱性神经酰胺酶基因与乳糖神经酰胺的微点阵分析

基因编码位点	基因注释	对数比率
At5G58980	中性/碱性非溶酶体神经酰胺酶1(Neutral/alkaline non-lysosomal ceramidase-like 1)	-6.2
At1G07380	中性/碱性非溶酶体神经酰胺酶2(Neutral/alkaline non-lysosomal ceramidase-like 2)	-2.1
At2G38010	中性/碱性非溶酶体神经酰胺酶3(Neutral/alkaline non-lysosomal ceramidase-like 3)	-1.6
At4g22330	碱性植物神经酰胺酶(alkaline phytoceramidase)	-2.3
At3g09020	4-alpha-乳糖神经酰胺半乳糖转移酶(Lactosylceramide 4-alpha-galactosyltransferase)	3.8

2.3 Northern杂交结果表明miR396负调控拟南芥类似神经酰胺酶基因

拟南芥类似神经酰胺酶基因家族包括3个成员，即*Atceramidase-like1*，*Atceramidase-like2*，*Atceramidase-like3*．Microarray结果显示在miR396高表达转基因植株中*Atceramidase-like1*，*Atceramidase-like2*和*Atceramidase-like3*的表达分别下降了-6.2，-2.1和-1.6倍．在此基础上，我们通过Northern杂交技术进一步验证上述研究结果．在*35S:MIR396a*和*35S:MIR396b*转基因植株叶中，与空载体相比较，*Atceramidase-like1*，*Atceramidase-like2*表达量明显降低(分别减少8倍、2倍以上)(图2)，而*Atceramidase-like3*的表达水平在*35S:MIR396a*转基因植株叶中有所下降，在*35S:MIR396b*转基因植株叶中变化不明显(图2)．相反地，在*35S:MIR396a*和*35S:MIR396b*转基因植株

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

叶中，miR396表达水平分别比空载体转基因植株增加2倍以上(图2)．上述研究结果进一步说明拟南芥miR396负调控*Ceramidase-like1*和*Ceramidase-like2*等基因的表达水平.

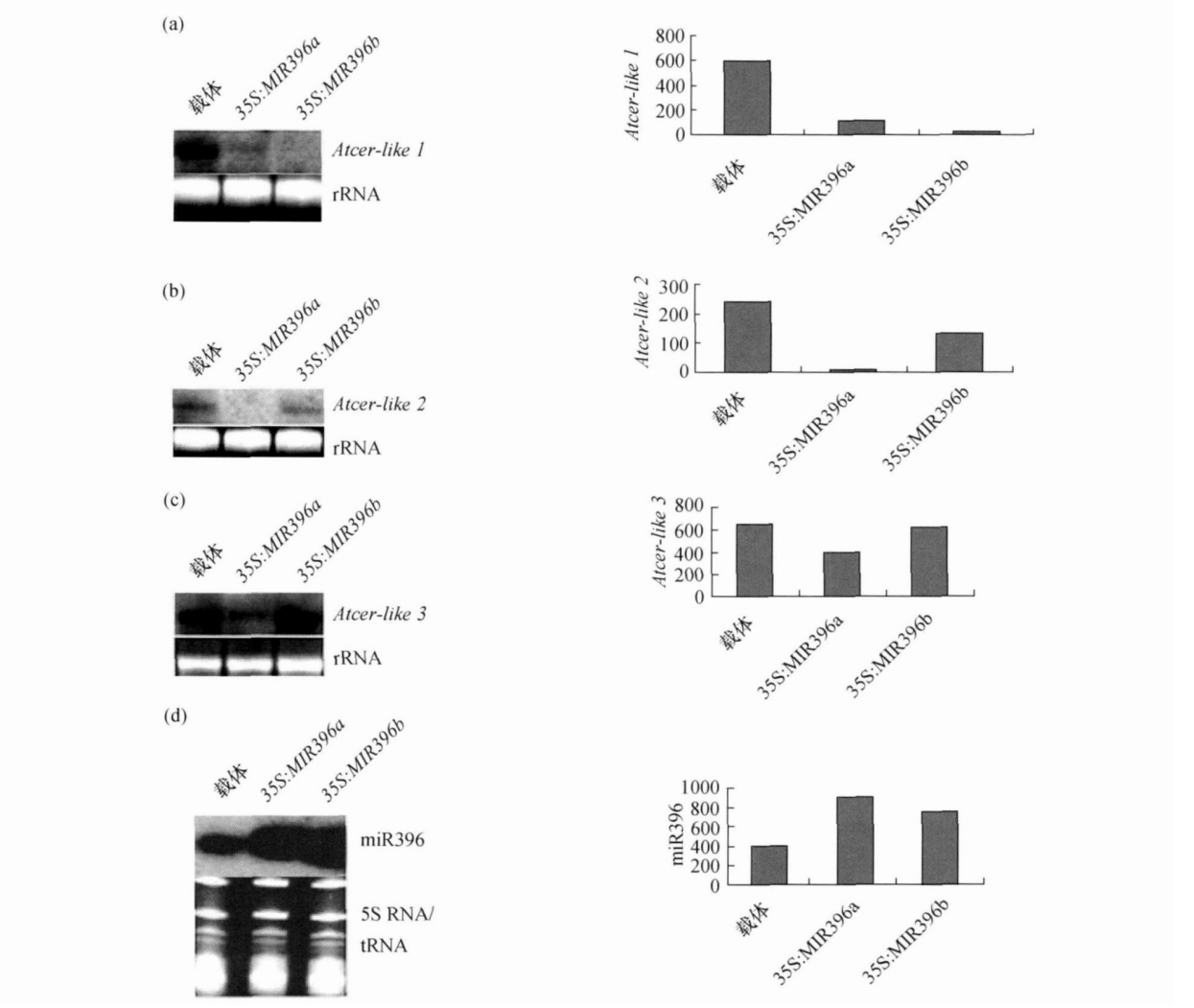

图2 *Atcer-like 1*(a)、*Atcer-like 2*(b)、*Atcer-like 3*(c)以及miR396(d)在载体、*35S::MIR396a*，*35S::MIR396b*转基因植株叶中的表达

选用生长期为25d的拟南芥提取总RNA．20μg总RNA用于大分子或小分子杂交

3 讨论

miR396在15个不同物种中被发现，是高度保守的小分子，并且其初始转录体和成熟的miRNA都是高度保守的．特别是成熟miRNA序列及其互补序列，这暗示miR396可能在植物发育方面具有重要且保守的功能[15]．我们的研究发现miR396确实具有多方面且重要的功能，本文论述了miR396通过负调控神经酰胺酶基因的表达来参与神经酰胺代谢途径的调控这一重要功能.

植物中神经酰胺由鞘胺醇生成，可以经葡糖神经酰胺合酶作用，神经酰胺糖基化，生成鞘糖脂；经神经酰胺酶作用，生成脂肪酸；经神经酰胺激酶作用，神经酰胺磷酸化，生成鞘磷脂[29](图3)．我们发现，在miR396高表达的转基因植株中，当神经酰胺酶减少时，乳糖神经酰胺半乳糖转移酶的量增加，这说明当神经酰胺酶转化途径受抑制时，神经酰胺主要向鞘糖脂转化(图3)，表明miR396可

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

以通过负调控拟南芥类神经酰胺酶基因来参与植物神经酰胺代谢途径的调控.

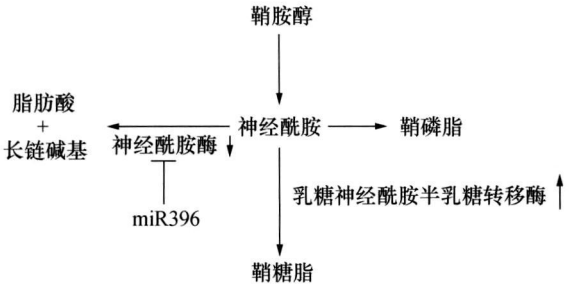

图3 **miR396** 参与拟南芥神经酰胺代谢途径

在植物中, miRNA 负调控靶基因的方式有两种, 即剪切或翻译抑制. 但这种调控产生的前提条件是 miRNA 与其靶基因的序列高度互补[7]. 根据神经酰胺酶与 miR396 序列的高度互补性(图 4), 以及 miR396 负调控神经酰胺酶基因, 可以推测神经酰胺酶基因可能是 miR396 的靶基因, 但这还需要5' RACE等实验的证明.

植物 miRNAs 的重要功能就是通过剪切或翻译抑制负调控靶基因. 研究这种功能的一个重要方法就是高表达 miRNA 前体, 从而导致 miRNAs 增加和其靶基因的水平降低[8]. 本文中 miR396 的两个前体被高表达后, miR396 的表达量增加而拟南芥类神经酰胺酶基因的表达量减少, 这说明 miR396 负调控神经酰胺酶基因表达水平. 至于这种负调控是通过剪切还是翻译抑制来完成, 还有待于进一步研究.

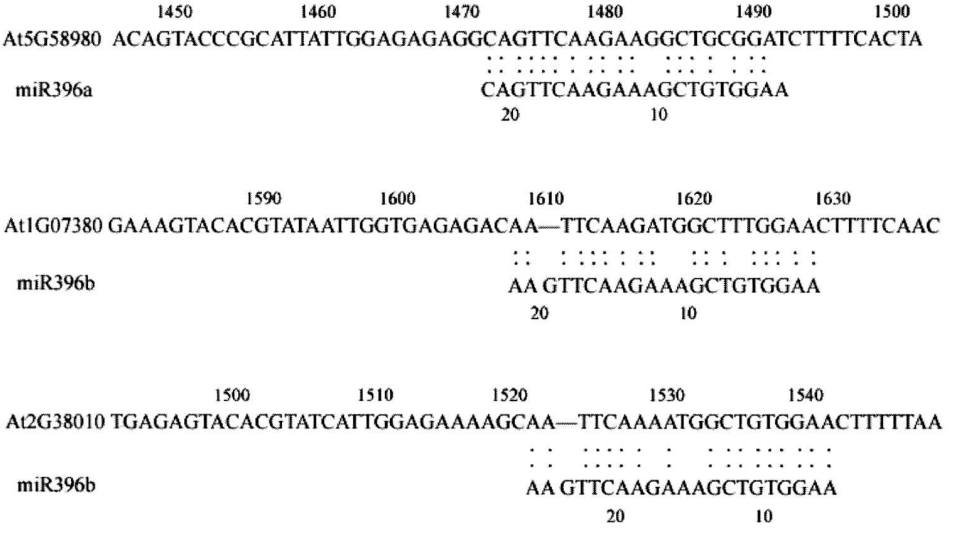

图4 **miR396** 与拟南芥神经酰胺酶类似基因高度互补

参 考 文 献

1 Bartel B, Bartel DP. MicroRNAs: At the root of plant development? Plant Physiology, 2003, 132: 709—717

2 Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell, 2004, 116: 281—297

3 Jones-Rhoades MW, Bartel DP. Computational identification microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. Molecular Cell, 2004, 14: 787—799

4 Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, et al. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans. Science, 2001, 294: 858—862

5 Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans. Science, 2001, 294: 862—864

6 Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, et al. MicroRNAs in plants. Genes & Development, 2002, 16: 1616—1626

7 Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. The Annual Review of Plant Biology, 2006, 57: 19—53

8 Guo HS, Xie Q, Fei JF, et al. MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulation auxin signals for Arabidopsis lateral root development. The Plant Cell, 2005, 17: 1376—1386

9 Palatnik JF, Allen E, Wu X, et al. Control of leaf morphogene-

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

sis by microRNAs. Nature, 2003, 425: 257—263

10 Aukerman MJ, Sakai H. Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes. The Plant Cell, 2003, 15: 2730—2741

11 Plantas DB, Investigaciones BC. MicroRNA: More than a role in plant development? Molecular Plant Pathology, 2004, 5: 361—366

12 Kasschau KD, Xie Z, Allen E, et al. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. Dev Cell, 2003, 4: 205—217

13 Sunkar R, Zhu JK. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. Plant Cell, 2004, 16: 2001—2019

14 Wang XW, Zhang J, Gu J, et al. MicroRNA identification based on sequence and structure alignment. Bioinformatics, 2005, 21: 3610—3614

15 Zhang B, Pan X, Cannon CH, et al. Conservation and divergence of plant microRNA genes. Plant J, 2006, 46: 243—259

16 Van WJ, van AH, Veldman RJ, et al. Ceramide: Second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? Biochem J, 2003, 369: 199—211

17 Hannun YA, Luberto C, Argraves KM. Enzymes of sphingolipid metabolism: From modular to integrative signaling. Biochemistry, 2001, 40: 4893—4903

18 Sperling P, Blume A, Zahringer U, et al. Further characterization of Delta(8)-sphingolipid desaturases from higher plants. Biochemical Society Transactions, 2000, 28: 638—641

19 Han GS, Gable K, Monaghan E, et al. Phytospingosine induces relocalization of serine palmitoyltransferase from the nuclear/ER membrane to a novel structure in Saccharomyces cerevisiae. Molecular Biology of the Cell, 2001, 12: 249a

20 Sperling P, Ternes P, Moll H, et al. Functional characterization of sphingolipid C4-hydroxylase genes from Arabidopsis thaliana. Febs Letters, 2001, 494: 90—94

21 Tamura K, Mitsuhashi N, Hara-Nishimura I, et al, Characterization of an arabidopsis cDNA encoding a subunit of serine palmitoyltransferase, the initial enzyme in sphingolipid biosynthesis. Plant and Cell Physiology, 2001, 42: 1274—1281

22 Ng CK, Carr YK, McAinsh MR, et al. Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. Nature, 2001, 411: 219

23 Coursol SL, Fan M, Stunff HL, et al. Sphingolipid signalling in Arabidopsis guard cells involves heterotrimeric G proteins. Nature, 2003, 423: 651—654

24 Pandey S, Assmann SM. The Arabidopsis putative G protein-coupled receptor GCR1 interacts with the G protein alpha subunit GPA1 and regulates abscisic acid signaling. Plant Cell, 2004, 16: 1616—1632

25 Coursol S, Stunff HL, Lynch DV, et al. Arabidonsis sphingosine kinase and the effects of phytosphingosine-1-phosphate on stomatal aperture. Plant Physiology, 2005, 137: 724—737

26 Niu Y, Chen KL, Wang JZ, et al. Molecular and functional characterization of sphingo-sine-1-phosphate lyase homolog from higher plants. Journal of Integrative Plant Biology, 2007, 49: 323—335

27 Clough SJ, Bent AF. Floral dip: A simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. Plant J. 1998, 16: 735—743

28 Huwiler A, Kolter T, Pfeilschifter J, et al. Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2000, 1485: 63—99

29 Lynch DV, Dunn TM. An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function. New Phytologist, 2004, 161: 677—702

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net