

基于烟草瞬时表达体系对 amiRNA 沉默效果快速有效的预验证

王健^{1,2*}

(1. 安康学院农学与生命科学学院, 陕西安康 725000; 2. 教育部药用植物资源与天然药物化学重点实验室和西北濒危药材资源开发国家工程实验室, 陕西师范大学生命科学学院, 西安 710062)

摘要: amiRNA (artificial microRNA) 作为一种诱导基因发生特异性沉默的技术已在多种植物中应用, 但设计出的不同 amiRNAs 在所转化株系中的沉默效率难以预测, 因此对 amiRNA 载体的沉默效率进行预验证是非常必要的。本实验以丹参 (*Salvia miltiorrhiza*) 的 1 个 MYB 类转录因子基因 *SmPAP1* 的 mRNA 序列为 amiRNA 作用对象, 并挑选 2 个经在线软件 WMD3 (Web MicroRNA Designer) 设计的 amiRNAs, 分别命名为 amiRNA1-*SmPAP1* 和 amiRNA2-*SmPAP1*, 然后通过农杆菌介导将构建的 2 个 amiRNA 载体和 *SmPAP1* 过表达植物载体在烟草叶片细胞中进行瞬时共表达。结果显示, amiRNA2 的表达丰度约是 amiRNA1 的 2 倍; amiRNA2 对靶标 *SmPAP1* 的沉默效率约是 amiRNA1 的 2.5 倍; *SmPAP1* 在 mRNA 和蛋白水平上均与相应 amiRNA 的表达水平呈显著负相关。因此, amiRNA 在烟草细胞中的瞬时表达可快速、有效地对不同 amiRNA 沉默效果进行预验证, 从而为后续的植物遗传转化研究提供重要参考。

关键词: 人工 microRNA; 瞬时表达; 基因沉默效率

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2015)06-0819-10

Rapid and Effective Pre-validation of amiRNA Silencing Strength by Transient Expression in *Nicotiana benthamiana*

WANG Jian^{1,2*}

(1. College of Agriculture and Life Science, Ankang University, Ankang, Shaanxi 725000, China; 2. Key Laboratory of Ministry of Education for Medicinal Resources and Natural Pharmaceutical Chemistry, National Engineering Laboratory for Resource Developing of Endangered Chinese Crude Drugs in Northwest China, College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710119, China)

Abstract: The utility of artificial microRNA (amiRNA) to induce specific gene silencing has been reported in many plant species, but silencing efficiency of differently designed amiRNA constructs in transgenic plants is less predictable. Thus, pre-validation of the silencing efficiency of designed amiRNA constructs is indispensable. In this study, to target the mRNA of *SmPAP1*, a R2R3-MYB transcription factor gene of *Salvia miltiorrhiza*, two amiRNAs were designed using WMD3 (Web MicroRNA Designer), designated as amiRNA1-*SmPAP1* and amiRNA2-*SmPAP1*, respectively. The transient co-expressions of the two amiRNAs constructs combined with the 35S : *SmPAP1* plant over-expression vector were subsequently examined by *Agrobacterium*-mediated transformation into tobacco leaf cells, respectively. Results showed that the expression level of amiRNA2 was almost twice that of amiRNA1, and the silencing strength of *SmPAP1* by amiRNA2 was 2.5 times higher than that by amiRNA1. The significant negative correlation between amiRNA abundance and

收稿日期: 2015-06-10, 退修日期: 2015-07-17。

基金项目: 国家自然科学基金(31170281, 31270338); 陕西省自然科学基金(2011K-16-02-01); 安康学院高层次人才科研启动基金(AYQDZR200926)。

作者简介: 王健(1969-), 男, 博士, 副教授, 主要从事植物基因工程及转基因研究。

* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: wangjianswj@163.com)。

expression level of *SmPAPI* at both the mRNA and protein level was observed in the transient agro-infiltration assays. Therefore, the assay for the transient expression of amiRNA in tobacco leaf cells can rapidly and effectively pre-validate silencing efficiency of diverse designed amiRNAs, and provide an important reference for subsequent genetic transformation in plants.

Key words: Artificial microRNA; Transient expression; Gene silencing efficiency

amiRNA 是近几年发展起来的一种诱导基因发生特异性沉默的新技术。植物中没有天然的 amiRNA, 也不能自然产生相应的 amiRNA, 它是经内源 miRNA 前体加工形成、长度约为 21 nt 的单链 RNA。只要保留内源 miRNA 骨架中的茎环结构不变, 通过置换可将内源 miRNA 前体的 miRNA/miRNA* 替换为需要的 amiRNA/amiRNA*, 就能达到特异干扰预期靶基因的目的。通过人工设计, 能够将 amiRNA 设计成仅靶向沉默一个单一基因或者多个具有保守结构域的多基因家族不同成员, 因此 amiRNAs 技术可通过形成一个特定序列的高效 small RNA 来避免对相似序列的非靶基因的影响。鉴于 amiRNA 对靶基因的高特异性, 人们在基因功能研究的方法上逐渐从 hpRNAi 技术转向新型的 amiRNA 技术, 并且随着这一技术不断得到验证、完善和迅速发展, 先后在拟南芥^[1]、水稻^[2]、苔藓^[3]、衣藻^[4]、茄子^[5]等植物中高效沉默一个或多个目的基因的表达。

Ai 等研究表明, 通过人工设计而构建的不同 amiRNAs 在其所转化株系中的表达水平差异较大, 而且 amiRNA 的表达水平与靶基因的沉默效果之间呈正相关性^[6], 因此获得高表达水平的 amiRNA 转化株系对于增加靶基因的沉默效率具有关键作用。大多数植物的遗传转化体系构建均是通过植物组织培养再生体系形成转化株系再生苗以及再生植株的抗生素筛选, 这是一个耗时、实验操作步骤冗长的过程。虽然通过农杆菌介导 (agro-infiltration) 的目的基因在植物细胞中的瞬时表达可以为基因的表达水平提供一个快速、简单的检测方法, 但瞬时表达结果并不能够准确反映稳定转化株系中基因的表达。Alpeter 等认为基因在瞬时表达和稳定转化株系中的表达无直接相关性^[7], 但 Telly 等和 Ahn 等研究发现, 瞬时表达条件的优化可使植株的遗传转化效率大幅度提高^[8,9]。尽管构建的一些 small

RNAs (包括 amiRNA) 能够在农杆菌液浸染的植物组织中被检测到瞬时表达, 但对于植物遗传转化的 amiRNA 的选择上, 其瞬时表达结果能否为稳定转化株系提供一个有效的参考值得进一步研究。

本研究拟选取丹参 (*Salvia miltiorrhiza*) 的 1 个 R2R3 MYB 类转录因子基因 *SmPAPI* 为研究对象, 利用在线软件 WMD (<http://wmd3.weigelworld.org>) 分别在其核苷酸序列 3' 端区域设计相应的 amiRNA, 再通过农杆菌介导将构建的 amiRNA 载体和 *SmPAPI* 过表达植物载体在烟草叶片细胞中进行瞬时共表达, 以期通过比较 2 个 amiRNA 的表达水平及其对靶基因的沉默效果, 来探讨 amiRNA 的瞬时表达结果能否作为一个方便、快捷的方法对经人工设计而构建的不同 amiRNA 进行预选择, 从而为进一步的植物遗传转化研究提供重要参考。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 DH5 α 、根癌农杆菌 EHA105 和植物表达载体 pCambia1302 由教育部药用植物资源与天然药物化学重点实验室保存。植物表达载体 pCambia35s::C3F 由加州大学河滨分校陈雪梅教授实验室提供。质粒 pRS300 由中国科学院遗传与发育生物研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 amiRNAs 的分子设计及其前体的克隆

利用在线软件 WMD (<http://wmd2.weigelworld.org>) 分别在丹参 *SmPAPI* 基因 cDNA 序列的 3' 端区域设计相应的用于构建 amiRNA 的引物 I、II、III、IV (表 1), 然后通过 over-lapping PCR 置换拟南芥 At319a 中的 miRNA/miRNA* 序列。PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳回收、纯化、连接至克隆载体 PMD-18T 上, 并转化到大肠杆菌 DH5 α

表 1 Over-lapping PCR 扩增的引物序列
Table 1 Primer sequences used for over-lapping PCR

扩增引物 Primers	引物序列 Primer Sequence (5'-3')
amiRNA1/amiRNA1*	
I	GATAAGCTGCATATACTCGGCGTTCTCTCTTTGTATTCC
II	GAACGCCGAGTATATGCAGCTTATCAAAGAGAATCAATGA
III	GAACACCGAGTATATCCAGCTTTTCACAGGTCGTGATATG
IV	GAAAAGCTGGATATACTCGGTGTTCTACATATATATTCT
amiRNA2/amiRNA2*	
I	GATTCTCATGGGTTTGGGCGCGTTCTCTCTTTGTATTCC
II	GAACGCGCCCAAACCGATGAGAATCAAAGAGAATCAATGA
III	GAACACGCCCAAACCGATGAGATTCACAGGTCGTGATATG
IV	GAATCTCATCGGTTTGGGCGGTGTTCTACATATATATTCT

感受态细胞中;挑取阳性克隆,经测序验证其序列正确性。Over-lapping PCR 扩增程序参考 Detlef Weigel 实验室提供的“Protocol for cloning of artificial microRNAs”。以获得的测序正确的 over-lapping PCR 产物为模版,利用两端分别加有 *Bgl* II 或 *Bst*E II 酶切位点的上、下游引物(*Bgl* II: 5'-CAT-GGTNACCGATAAGCTGCATATACTCGGCG-T-3' 和 5'-CATAGATCTGAACACCGAGTATATCC-AGCTTT-3'; *Bst*E II: 5'-CATGGTNACCGATTG-TCAT-GGGTTTGGGCGCG 和 5'-CATAGATCTGAACACGCCCAAACCGATGAGA-TT-3') 分别扩增 amiRNA1/amiRNA1*、amiRNA2/amiRNA2* 的前体结构序列。PCR 扩增产物经回收、转化以及测序确定其扩增序列的正确性。

1.2.2 35S:amiRNA-*SmPAP1* 植物表达载体的构建及其对农杆菌的转化

对经测序验证其序列正确的、包含 amiRNA1/amiRNA1* 或 amiRNA2/amiRNA2* 前体结构序列的质粒和 pCambia1302 载体分别用 *Bgl* II 和 *Bst*E II 进行双酶切;回收酶切的相应片段且用 T4 DNA 连接酶 4℃ 连接,并分别将 amiRNA/amiRNA* 前体序列与 pCambia1302 载体进行连接;然后利用已构建的重组质粒对农杆菌 EH105 进行转化,具体转化程序参考王仕英等^[10]的方法进行。

1.2.3 35S:*SmPAP1* 植物表达载体的构建

将丹参 *SmPAP1* 基因的开放阅读框(ORF)序列连接到 TSK108 载体上,并经测序验证正确后,将其通过重组酶系统转移至经过改造的 pCambia1302 载体(pCambia35s:C3F)CaMv-35S 启动子与 Nos 终止子之间,以构建 35S:*SmPAP1* 植物过

表达载体。

1.2.4 amiRNA 和 *SmPAP1* 在烟草中的瞬时表达

将保存的含有目的载体 35S:*SmPAP1* 的农杆菌菌液在含有相应抗生素的 LB 固体培养基上划平板,28℃ 暗培养约 36 h;挑取单克隆到附加相应浓度卡那霉素的 LB 液体培养基(400 μL)中,28℃ 振荡(160 r/min)培养过夜;测量菌液 OD 且当 OD₆₀₀ = 0.6~0.8 时,将菌液离心并用 10 mmol/L 氯化镁重新悬浮菌体沉淀;调节 OD₆₀₀ = 0.1,加入 100 mmol/L 乙酰丁香酮(Acetosyringone, As),振荡混匀,室温静置 4 h;然后将菌液注射到烟草叶片中,并把烟草植株置于 25℃ ± 2℃、光周期:16 h 光照/8 h 黑暗、光照强度为 2000 lx 的条件下培养 2~4 d。同时,将含有 pCambia1302 空载体的农杆菌液注射到烟草叶片中作为阴性对照。

1.2.5 amiRNA 和 *SmPAP1* mRNA 表达水平的 PCR 检测

盐酸胍法提取总 RNA,具体实验操作程序参考 Schlappi 等^[11]用 DNase I 处理提取总 RNA(以除去保留的痕量 DNA)。采用 PrimeScript™ RT reagent Kit (TAKARA, 中国大连)对纯化的总 RNA 进行 cDNA 反转录,使用 One Step PrimeScript miRNA cDNA Synthesis Kit (TAKARA, 中国大连)对 amiRNA 进行 polyA 加尾及其反转录。以烟草持家基因 *ubiquitin* 作为内参基因,采用半定量 RT-PCR 以及实时定量 PCR (real-time PCR)方法对 amiRNA 和 *SmPAP1* 的表达水平分别进行检测。实时荧光定量 PCR 反应程序遵照“iQ™5 多重实时荧光定量 PCR 说明书”进行设定,其引物序列详见表 2。

表 2 实时定量 RT-PCR 引物序列
Table 2 Primer sequences used for quantitative real-time PCR

引物名称 Primers	引物序列 Primer sequence (5'-3')
<i>Nt-UBI-F</i>	TCCAGGACAAGGAGGGTAT
<i>Nt-UBI-R</i>	GAGACCTCAGTAGACAAAGC
<i>SmPAP1-1-F</i>	ATGAGAGTCTCCTCGCGGAGC
<i>SmPAP1-1-R</i>	ACCTCAACACCAACGCGAGCCAC
<i>SmPAP1-2-F</i>	GCGGAAAGAGCTGCAGATTGAG
<i>SmPAP1-2-R</i>	GGATCCTCCACCTCCGGCCAG
<i>amiR1-PAP1-1</i>	GATAAGCTGCATATACTCGGCG
<i>amiR2-PAP1-1</i>	GATTCTCATGGGTTTGGGCGCGT

1.2.6 amiRNA 的 Small Northern Blotting 检测

采用盐酸胍法提取总 RNA，并用 T4 PNK 对相关探针进行 P³² 的同位素标记。随后 Small RNA 的电泳分离、转膜、膜的交联、探针的标记以及与 Small RNA 杂交、压片和曝光均按照 Li 等^[12]所采用的程序进行。

1.2.7 SmPAP1 蛋白表达的 Western Blotting 检测

取待检测的幼嫩烟草叶片(约 1 cm × 1 cm)放入 50 mL 的离心管中，加入液氮充分研磨；加入 SDS 上样缓冲液，并于 100℃ 水浴锅中水浴 10 min，然后置于离心机中 10000 r/min 离心 5 min，取 5 μL 匀浆上清液并准备电泳上样。SDS-PAGE 的制备、电泳分离、转膜、膜的封闭、杂交及显色均参照 Li 等^[12]的程序进行。

2 结果与分析

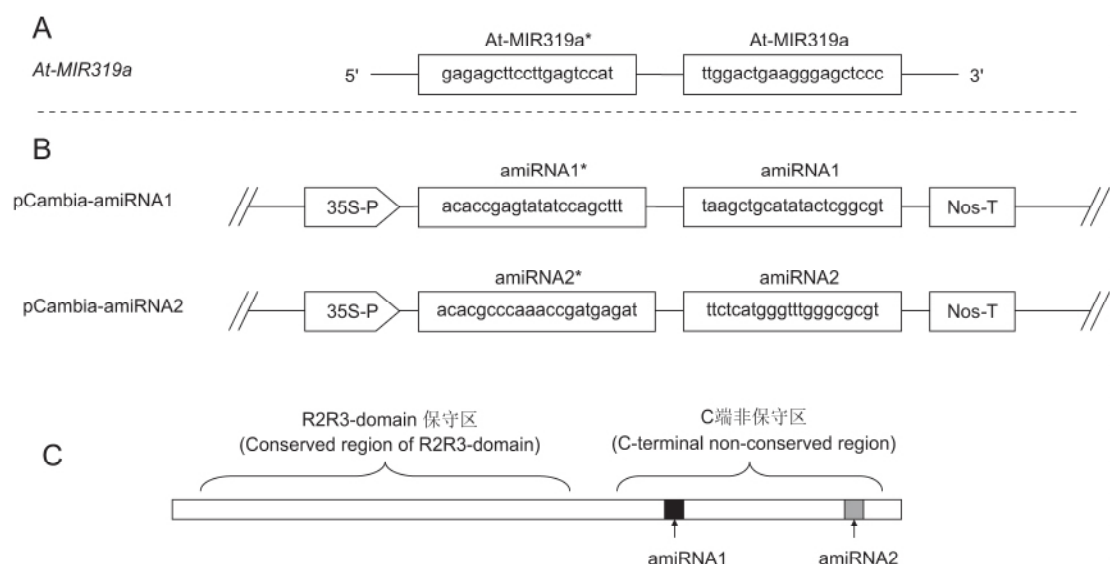
2.1 35S : amiRNA1-SmPAP1 和 35S : amiRNA2-SmPAP1 植物表达载体的构建

为了提高设计的 amiRNA 对 *SmPAP1* 的沉默特异性，我们对 *SmPAP1* 的氨基酸序列进行保守结构域分析，以保证本实验设计的 amiRNA 作用靶点尽量位于非保守结构域所对应的核苷酸区域，从而降低 amiRNA 对其他基因沉默的可能性。从在线软件 WMD 设计的很多 amiRNA 中选择出位于 *SmPAP1* mRNA 3' 端的 amiRNA1 和 amiRNA2。软件 WMD 对 amiRNA 的评价指数显示，amiRNA1 综合指数优于 amiRNA2，并且 amiRNA1 和 amiRNA2 与 *SmPAP1* mRNA 潜在靶定位点的杂交能级分别是一 45.37 和 -49.23。amiR-

NA1 和 amiRNA2 及其相对应的 amiRNA1* 和 amiRNA2* 序列信息和相应的植物表达载体构建思路如图 1 所示。为了获得 amiRNA 的前体序列，以质粒 pRS300 为模板，利用 over-lapping PCR 把 pRS300 中拟南芥 *At-MIR319a* 的 miRNA/miRNA* 序列置换为本实验设计的 amiRNA1/amiRNA1* 和 amiRNA2/amiRNA2* 序列，然后通过 over-lapping PCR 扩增产物酶切位点的添加、酶切和连接，最终插入到 pCambia1302 的 35S 启动子与 Nos 终止子之间(图 2)。测序结果显示，构建的重组植物表达载体上均含有相应的 amiRNA/amiRNA* 茎环结构序列，而且序列信息与本实验设计的序列信息完全一致，表明利用 over-lapping PCR 技术成功构建了 amiRNA1-SmPAP1 和 amiRNA2-SmPAP1 植物表达载体。

2.2 amiRNA 在烟草叶片中的瞬时表达水平

为了检验构建的 amiRNA 植物表达载体在植物组织细胞中的表达情况，分别将 amiRNA1-SmPAP1 和 amiRNA2-SmPAP1 植物表达载体在烟草叶片细胞中进行瞬时表达分析。为了减少实验的随机误差，尽量选取被农杆菌液浸润的不同部位、大小一致的幼嫩烟草叶片进行冷冻保存、备用。实时定量 PCR 检测结果显示(图 3: A)，在阴性对照(野生型烟草，CK)组中未出现相应的特异性 PCR 扩增产物；在 2 个实验组(amiRNA1 和 amiRNA2)中均出现特异性的 PCR 扩增目的产物，而且 amiRNA2-SmPAP1 的表达量明显高于 amiRNA1-SmPAP1。为了进一步验证实时定量 PCR 的检测结果，分别对 2 个实验组样品中的总 RNA 做了 Small RNA Northern Blotting，以验证所扩增 small RNA 的序列真实性。杂交结果显示(图 3: B)，在实验组(pCambia-amiR1 和 pCambia-amiR2)泳道中均出现大小约为 20 nt 的杂交条带，但 amiRNA1-SmPAP1 的杂交条带亮度弱于 amiRNA2-SmPAP1；杂交条带的信号强度与实时定量 PCR 检测的表达水平较为一致，均证明 amiRNA2 的表达丰度明显高于 amiRNA1。尽管本实验构建的 amiRNA 前体序列茎环结构是一致的，但由于 amiRNA 及其 amiRNA* 序列存在差异，导致不同的 amiRNA 植物表达载体的表达水平也存在较大差异。



A: 拟南芥 MIR319a 前体茎环结构线状图, 方框内序列为 MIR319a 和 MIR319a*; B: amiRNA1 和 amiRNA2 表达载体结构示意图, 方框内序列分别为人工设计的 amiRNA1 和 amiRNA2 及其对应的 amiRNA1* 和 amiRNA2*; C: amiRNA1 和 amiRNA2 靶定的作用位点。35S-P: *CaMV* 35S 启动子; Nos-T: *Nos* 终止子。
 A: Linear structure of the *At-MIR319a* stem-loop structure. Sequences of MIR319a and its complementary region (approximately MIR319a*) in the gene are displayed in boxes. B: Structure of binary vectors for expression of amiRNA1 and amiRNA2. Construct names are indicated on the left. The sequences of the designed amiRNA and its complementary region (approximately amiRNA*) are displayed in boxes. C: Representation of amiRNA1 and amiRNA2 targeting sites for *SmPAP1*, respectively. 35S-P: *CaMV* 35S promoter; Nos-T: *Nos* terminator.

图 1 35S:amiRNA-*SmPAP1* 植物表达载体构建的设计思路
 Fig. 1 Design representation of 35S:amiRNA-*SmPAP1* constructs

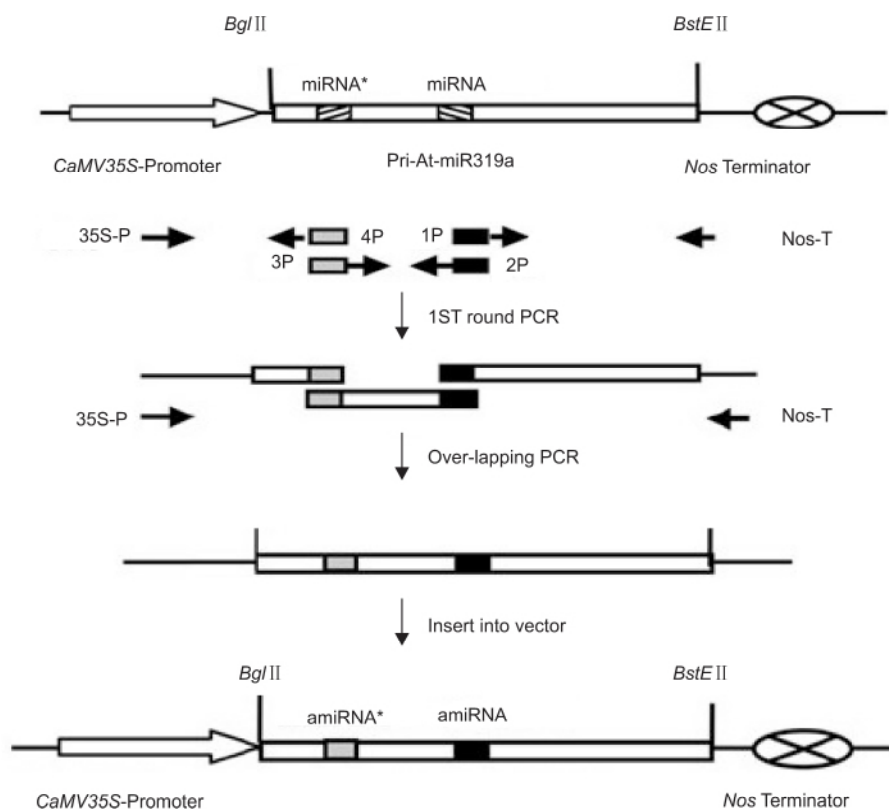
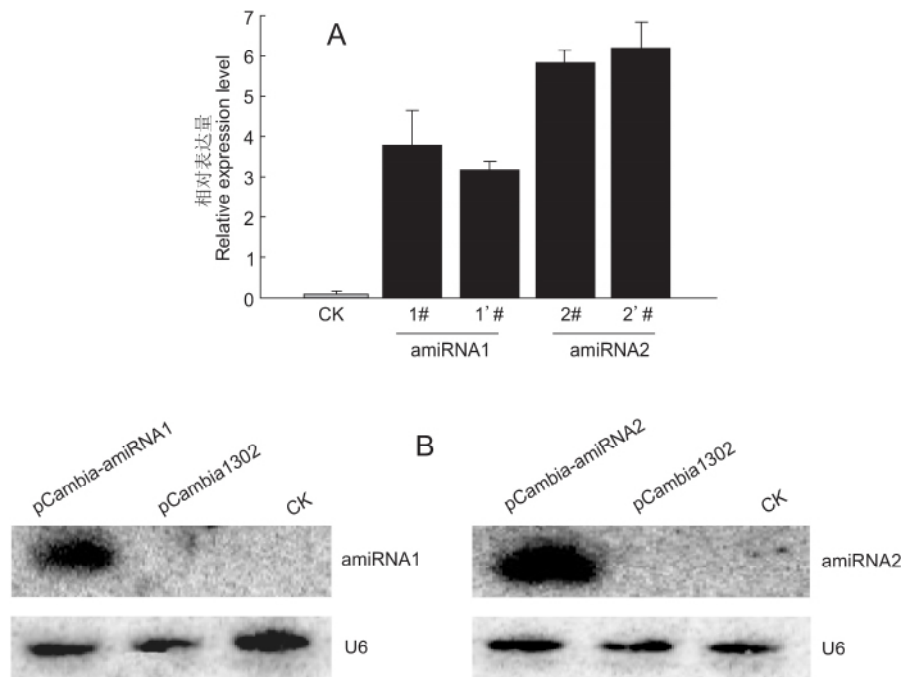


图 2 35S:amiRNA-*SmPAP1* 构建流程示意图
 Fig. 2 Schematic diagram of 35S:amiRNA-*SmPAP1* construct



A: amiRNA1 和 amiRNA2 的实时定量 PCR 检测; 1# 和 1' #、2# 和 2' # 分别代表 amiRNA1 或 amiRNA2 实时定量 PCR 检测的两次生物学重复。B: amiRNA1 和 amiRNA2 的 Small RNA Northern Blotting 验证; pCambia-amiRNA1 和 pCambia-amiRNA2: 用分别含有 amiRNA1-SmPAP1 或 amiRNA2-SmPAP1 植物表达载体的农杆菌液浸染的烟草叶片提取的总 RNA; pCambia1302: 用含有空载体 pCambia1302 植物表达载体的农杆菌液浸染的烟草叶片提取的总 RNA; CK: 从野生型烟草叶片中提取的总 RNA。烟草 *ubiquitin* 基因作为实时定量 PCR 检测的内参基因。拟南芥 U6 为 Small RNA Northern Blotting 总 RNA 上样量内参。

A: Detection of both amiRNA1 and amiRNA2 abundance by real-time PCR; 1# and 1' #, and 2# and 2' # represent two biological replicates of amiRNA1 and amiRNA2 abundance by real-time PCR, respectively. B: Detection of amiRNA abundance by small RNA Northern Blotting assay; Lane pCambia-amiRNA1 and pCambia-amiRNA2: Total RNAs from tobacco leaf infiltrated by agrobacterial solution containing amiRNA1-SmPAP1 or amiRNA2-SmPAP1 expression vector, respectively; Lane pCambia1302: Total RNA from tobacco leaf infiltrated by agrobacterial solution only containing pCambia1302 blank vector; CK: Total RNA from wild-type tobacco leaf. The *ubiquitin* gene of tobacco was used as the internal reference for real-time PCR. U6 was used as the internal reference for sample loading of total RNA in small RNA Northern blotting.

图 3 amiRNA1 和 amiRNA2 在烟草叶片细胞中的瞬时表达水平

Fig. 3 Assay for transient expression level of amiRNA1 and amiRNA2 in tobacco leaf cells

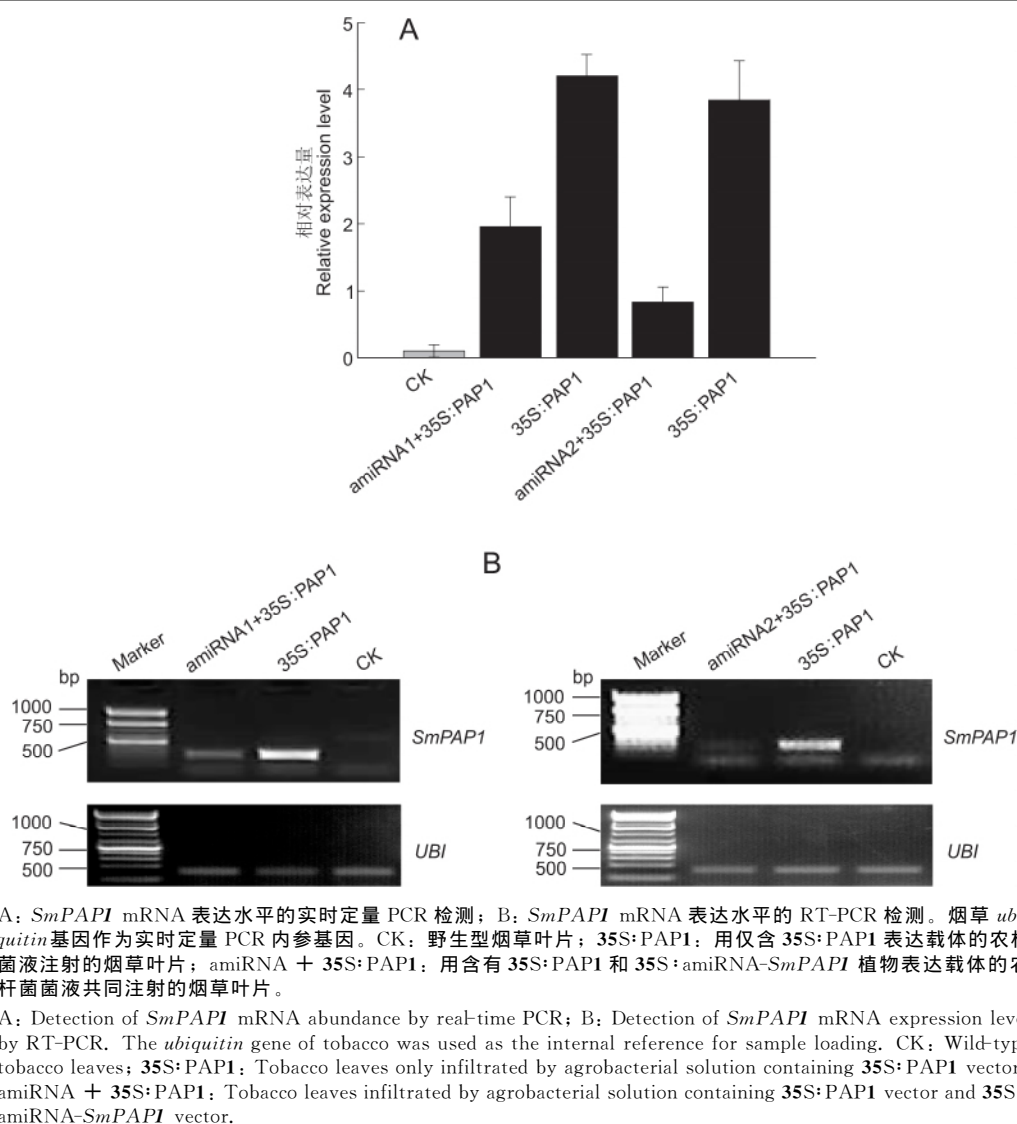
2.3 烟草中 SmPAP1 mRNA 表达水平的变化

为了验证所表达的 amiRNA 是否对靶基因 *SmPAP1* 产生特异性沉默, 将构建的 2 个 amiRNA 过表达植物载体分别和 *SmPAP1* 过表达植物载体在烟草叶片细胞中进行瞬时共表达, 以检测 2 个 amiRNA 的表达对靶基因 *SmPAP1* 的沉默效果。因 2 个 amiRNA 与 *SmPAP1* mRNA 预期的结合位点不同, 并且为了更加准确、客观的反映 *SmPAP1* mRNA 表达水平的变化, 我们设计的实时定量 PCR 上、下游引物均分别位于预期作用位点的两侧。*SmPAP1* 在烟草叶片中瞬时表达的实时定量 PCR 检测结果显示(图 4: A), 与阴性对照组(仅含 35S:PAP1 表达载体)相比, 2 个实验组合中 *SmPAP1* 的 mRNA 表达水平均显著下降, 而且

amiRNA2 对 *SmPAP1* 的沉默效果优于 amiRNA1。半定量 RT-PCR 检测结果显示(图 4: B)中, 在 amiRNA1 + 35S:PAP1 组合和 amiRNA2 + 35S:PAP1 组合分别得到 240 bp 和 450 bp 的特异性条带, 即 PCR 扩增产物大小基本与预期一致, 而在阴性对照组没有预期大小的扩增条带出现; 与 amiRNA1 + 35S:PAP1 组合中 *SmPAP1* 的扩增条带相比, amiRNA2 + 35S:PAP1 组合中 *SmPAP1* 的扩增条带亮度很弱, 表明 amiRNA2 对 *SmPAP1* 的沉默效果较好, 这与实时定量 PCR 对 *SmPAP1* mRNA 表达水平的检测结果一致。

2.4 烟草中 SmPAP1 融合蛋白的表达水平

在植物体内, miRNA 对靶基因的下调不仅体现在 mRNA 水平的剪切, 而且还抑制其翻译, 因



A: *SmPAP1* mRNA 表达水平的实时定量 PCR 检测; B: *SmPAP1* mRNA 表达水平的 RT-PCR 检测。烟草 *ubiquitin* 基因作为实时定量 PCR 内参基因。CK: 野生型烟草叶片; 35S:PAP1: 用仅含 35S:PAP1 表达载体的农杆菌液注射的烟草叶片; amiRNA + 35S:PAP1: 用含有 35S:PAP1 和 35S:amiRNA-*SmPAP1* 植物表达载体的农杆菌液共同注射的烟草叶片。

A: Detection of *SmPAP1* mRNA abundance by real-time PCR; B: Detection of *SmPAP1* mRNA expression level by RT-PCR. The *ubiquitin* gene of tobacco was used as the internal reference for sample loading. CK: Wild-type tobacco leaves; 35S:PAP1: Tobacco leaves only infiltrated by agrobacterial solution containing 35S:PAP1 vector; amiRNA + 35S:PAP1: Tobacco leaves infiltrated by agrobacterial solution containing 35S:PAP1 vector and 35S:amiRNA-*SmPAP1* vector.

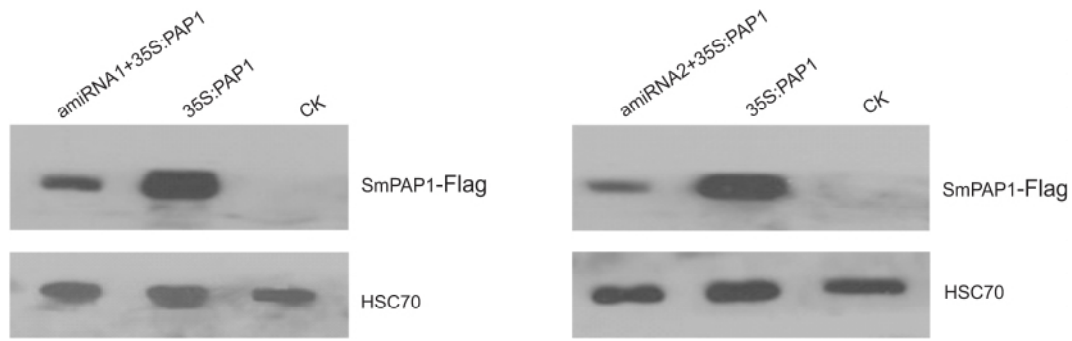
图 4 烟草叶片中 amiRNA 的表达对 *SmPAP1* mRNA 表达水平的影响
Fig 4 Effect of amiRNA on *SmPAP1* mRNA abundance in tobacco leaf cells

此为了进一步研究 2 个 amiRNA 对靶基因 *SmPAP1* 在蛋白水平上的沉默效果, 我们对 2 个实验组合中 *SmPAP1*-Flag 融合蛋白的表达进行了 Western Blotting 检测。结果显示(图 5), 6 个泳道中烟草 HSC70 蛋白(内参)的表达水平基本一致, 因此可对其他泳道中 *SmPAP1*-Flag 融合蛋白的表达量进行比较; 与阴性对照组相比, 2 个实验组合中 *SmPAP1*-Flag 融合蛋白的表达水平均显著下降, 而且 amiRNA2 + 35S:PAP1 组合中 *SmPAP1*-Flag 融合蛋白的表达量低于 amiRNA1 + 35S:PAP1 组合, 即 2 个实验组合中 *SmPAP1*-Flag 融合蛋白表达水平存在差异, 说明本实验设计的 2 个 amiRNAs 对靶基因 *SmPAP1* 的干涉程

度在蛋白表达水平和 mRNA 表达水平上是趋于一致的。

3 讨论

虽然目前成功利用拟南芥中 miR319a 的骨架构建 amiRNA 的报道比较多, 但不同的物种中存在不同的核糖核酸酶 III (DICER-LIKE1) 并识别不同的 miRNA 茎环结构。烟草叶片细胞中瞬时共表达的结果说明, 本实验构建的 2 个 amiRNA-amiRNA* 茎环结构均能够被相应的 miRNA 生源系统所识别和进一步的剪切、加工, 从而形成成熟的 amiRNA; 但在表达水平上, amiRNA2 的表达丰度



CK: 野生型烟草叶片; 35S:PAP1: 只用含 35S:PAP1 表达载体的农杆菌液注射的烟草叶片; amiRNA + 35S:PAP1: 用含有 35S:PAP1 以及 35S:amiRNA-SmPAP1 植物表达载体的农杆菌液共同注射的烟草叶片。烟草 HSC70 蛋白作为样品上样内参。

CK: Wild-type tobacco leaf; 35S:PAP1: Tobacco leaf only infiltrated by agrobacterial solution containing 35S:PAP1 vector; amiRNA + 35S:PAP1: Tobacco leaf infiltrated by both agrobacterial solution containing 35S:PAP1 vector and that containing 35S:amiRNA-SmPAP1 vector. HSC70 protein was treated as the internal reference for sample loading.

图 5 烟草中 SmPAP1 融合蛋白表达水平的 Western Blotting 检测

Fig. 5 Western blotting assay for the expression level of the SmPAP1-Flag fused protein in tobacco leaf cells

明显高于 amiRNA1。由于构建的 2 个 amiRNA-miRNA* 茎环结构均来自于同一个骨架, 而且进行瞬时表达的操作也相同, 因此造成不同 amiRNA 表达差异的原因很可能是设计的 amiRNA 和 amiRNA* 的序列存在差异。我们认为导致 amiRNA1 表达丰度低的原因可能有 2 个: 一是加工成熟的 amiRNA1 序列可能与自身 miRNA 前体(pre-amiRNA1)结合, 从而引起自身 miRNA 前体二级结构的局部修饰, 进而诱导了 amiRNA1 前体中 DICE-LIKE 酶识别位点构象的变化, 导致细胞内 DICE-LIKE 对其结构的识别能力降低, 从而影响了 amiRNA1 的正常剪切和加工过程^[13,14]; 二是不同加工成熟的 amiRNAs 由于存在序列上的差异, 导致二者在烟草叶片细胞中的降解速度不同^[12]。

不同的 amiRNA 载体转化到植物宿主细胞后其表达水平具有一定的差异^[1,6,15], 并且很多研究报道都证实转化株系中 amiRNA 的表达水平与靶 RNA 的沉默强度之间呈显著正相关, 因此获得 amiRNA 高表达水平的转化株系对增强靶基因的沉默效果尤为关键。为了使构建的 amiRNA 能够在植物体内进行高效表达, 除了对 amiRNA 及其 amiRNA* 的序列精心设计外, 在进行稳定遗传转化前若能通过某种手段对 amiRNA 的表达水平及对靶基因的沉默效率进行早期评价显得非常重要。

amiRNA 载体能够通过农杆菌介导在宿主细胞中进行瞬时表达^[16,17], 但存在瞬时表达与遗传转化所使用的植物种类不同这一问题。例如, 本实验瞬时表达是在烟草组织中, 而最终的遗传转化宿主是丹参植株, 但含有不同 amiRNA 序列的植物表达载体在烟草细胞中的瞬时表达结果可对所设计的 amiRNA 序列是否能够被正确加工、剪切并大量表达, 以及是否能够对靶标基因进行有效的沉默进行预验证, 因此不同 amiRNA 的瞬时表达结果可为后续稳定的遗传转化选择哪一种 amiRNA 载体提供快速参考。

通过软件 WMD 设计出来的 amiRNA 排序是基于经典的序列互补以及杂交能级, 并未考虑到如靶基因 mRNA 的结构、amiRNA 对靶标的翻译抑制^[18,19]等因素影响。植物内源 miRNA 通过翻译抑制方式对靶基因进行沉默日益受到研究者的重视^[12,20-24], 因此仅通过检测靶基因 mRNA 表达丰度的变化来确定设计的 amiRNA 对靶基因的沉默效率是不全面的。有研究显示^[25,26], 一些 amiRNA 也存在通过翻译抑制方式对靶基因进行沉默, 即其靶基因 mRNA 的表达丰度出现较小幅度的降低, 说明有些 amiRNA 对靶基因的沉默很可能是通过 mRNA 的剪切和翻译抑制同时来进行的。本实验结果显示, 2 个实验组合中 SmPAP1-Flag 融合蛋白表达存在差异且与 mRNA 表达水平变化是

趋于一致的, 排除了靶基因 *SmPAP1* 的 mRNA 水平并未能真实反映其最终沉默效率(蛋白表达水平)的可能性。靶基因在蛋白表达水平的下调程度并不一定与 mRNA 表达水平的下降保持一致, 因为某些 amiRNA 对靶基因的沉默不是仅仅体现在 mRNA 水平的切割, 而且还发生在蛋白表达水平的抑制, 因此通过瞬时表达体系在靶基因蛋白水平上评测设计的 amiRNA 对靶基因的沉默效率比在 mRNA 表达水平上更为准确、客观。

通过将构建的不同 amiRNA 植物表达载体和靶基因表达载体在烟草叶片细胞中进行瞬时共表达, 不仅可以预观察 amiRNA 在植物细胞中的表达效率, 而且还能检测其对靶标基因的沉默效率, 因此本实验可作为一个方便、快捷的方法对设计出的不同 amiRNA 进行预选择, 并为后续的植物遗传转化提供重要参考。

参考文献:

- [1] Schwab R, Ossowski S, Riester M, Warthmann N, Weigel D. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2006, 18(5): 1121—1133.
- [2] Warthmann N, Chen H, Ossowski S, Weigel D, Hervé P. Highly specific gene silencing by artificial miRNAs in rice[J]. *PLoS One*, 2008, 3(3): e1829.
- [3] Khraiweh B, Ossowski S, Weigel D, Reski R, Frank W. Specific gene silencing by artificial microRNAs in *Physcomitrella patens*: An alternative to targeted gene knockouts[J]. *Plant Physiol*, 2008, 148(2): 684—693.
- [4] Molnar A, Bassett A, Thuenemann E, Schwach F, Karkare S, Ossowski S, Weigel D, Baulcombe D. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Plant J*, 2009, 58(1): 165—174.
- [5] Toppino L, Kooiker M, Lindner M, Dreni L, Rotino GL, Kater MM. Reversible male sterility in eggplant (*Solanum melongena* L.) by artificial microRNA-mediated silencing of general transcription factor genes [J]. *Plant Biotechnol J*, 2011, 9(6): 684—692.
- [6] Ai T, Zhang L, Gao Z, Zhu C X, Guo X. Highly efficient virus resistance mediated by artificial microRNAs that target the suppressor of PVX and PVY in plants[J]. *Plant Biol*, 2011, 13(2): 304—316.
- [7] Altpeter F, Vasil V, Srivastava V, Stöger E, Vasil I K. Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) plants[J]. *Plant Cell Rep*, 1996, 16(1—2): 12—17.
- [8] Jelly NS, Valat L, Walter B, Maillot P. Transient expression assays in grapevine: a step towards genetic improvement[J]. *Plant Biotechnol J*, 2014, 12(9): 1231—1245.
- [9] Ahn YK, Yoon MK, Jeon JS. Development of an efficient *Agrobacterium*-mediated transformation system and production of herbicide-resistant transgenic plants in garlic (*Allium sativum* L.)[J]. *Mol Cells*, 2013, 36(2): 158—162.
- [10] 王仕英, 王浩如, 王健. 高羊茅 *FaChit1* 基因启动子的功能分析[J]. 植物科学学报, 2103, 31(6): 562—569.
- [11] Bubier J, Schläppi M. Cold induction of EARLI1, a putative *Arabidopsis* lipid transfer protein, is light and calcium dependent [J]. *Plant Cell Environ*, 2004, 27(7): 929—936.
- [12] Li S, Liu L, Zhuang X, Yu Y, Liu X, Cui X, Ji L, Pan Z, Cao X, Mo B, Zhang F, Raikhel N, Jiang L, Chen X. MicroRNAs inhibit the translation of target mRNAs on the endoplasmic reticulum in *Arabidopsis* [J]. *Cell*, 2013, 153(3): 562—574.
- [13] Ma JB, Yuan YR, Meister G, Pei Y, Tuschl T, Patel DJ. Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein[J]. *Nature*, 2005, 434(7033): 666—670.
- [14] Parker JS, Roe SM, Barford D. Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex[J]. *Nature*, 2005, 434(7033): 663—666.
- [15] Qu J, Ye J, Fang R. Artificial microRNA-mediated virus resistance in plants[J]. *J Virol*, 2007, 81(12): 6690—6699.
- [16] Tang Y, Wang F, Zhao J, Xie K, Hong Y, Liu Y. Virus-based microRNA expression for gene functional analysis in plants[J]. *Plant Physiol*, 2010, 153(2): 632—641.
- [17] Kung YJ, Lin SS, Huang YL, Chen TC, Harish SS, Chua NH, Yeh SD. Multiple artificial microRNAs targeting conserved motifs of the replicase gene confer

- robust transgenic resistance to negative-sense single-stranded RNA plant virus[J]. *Mol Plant Pathol*, **2012**, **13**(3): 303—317.
- [18] Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs[J]. *Annu Rev Biochem*, **2010**, **79**: 351—379.
- [19] Pasquinelli AE. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship[J]. *Nat Rev Genet*, **2012**, **13**(4): 271—282.
- [20] Aukerman MJ, Sakai H. Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes[J]. *Plant Cell*, **2003**, **15**(1): 2730—2741.
- [21] Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, Dunoyer P, Yamamoto YY, Sieburth L, Voinnet O. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs [J]. *Science*, **2008**, **320**(5880): 1185—1190.
- [22] Lanet E, Delannoy E, Sormani R, Floris M, Brodersen P, Cr  t   P, Voinnet O, Robaglia C. Biochemical evidence for translational repression by *Arabidopsis* microRNAs[J]. *Plant Cell*, **2009**, **21**(6): 1762—1768.
- [23] Zhu QH, Helliwell CA. Regulation of flowering time and floral patterning by miR172 [J]. *J Exp Bot*, **2011**, **62**(2): 487—495.
- [24] Meijer HA, Kong YW, Lu WT, Wilczynska A, Spriggs RV, Robinson SW, Godfrey JD, Willis AE, Bushell M. Translational repression and eIF4A2 activity are critical for microRNA-mediated gene regulation[J]. *Science*, **2013**, **340**(6128): 82—85.
- [25] Kim J, Somers DE. Rapid assessment of gene function in the circadian clock using artificial microRNA in *Arabidopsis* mesophyll protoplasts [J]. *Plant Physiol*, **2010**, **154**(2): 611—621.
- [26] Li JF, Chung HS, Niu Y, Bush J, McCormack M, Sheen J. Comprehensive protein-based artificial microRNA screens for effective gene silencing in plants [J]. *Plant Cell*, **2013**, **25**(5): 1507—1522.

(责任编辑: 刘艳玲)