

番茄果实中一种快速验证 microRNAs 的方法

马远征, 刘海平, 左进华, 傅达奇, 迟丽红, 朱本忠

(中国农业大学 食品科学与营养工程学院 北京 100083)

摘要:以番茄果实为材料,采用颈环引物的方法对番茄果实中的 miRNA159 和 miRNA168 进行反转录,并对得到的目的片段进行扩增,通过琼脂糖凝胶电泳观察得到相应大小的目的片段。对 miRNA159 所得大小正确的片段进行测序,验证所得片段为正确的目的片段。这种低成本的 miRNA 检测方法简单、实用,适用于生物信息预测及深度测序得到的低拷贝的新 miRNA 的快速验证。

关键词:miRNA; 深度测序; 颈环 RT-PCR; 验证表达

中图分类号:S 641.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)12-0093-03

miRNAs 也称为微小 RNA、microRNA,是一类来源于染色体的非编码区域大小约为 21~23 个核苷酸(nt)的 RNA 分子,miRNAs 一般由大约 70 nt 大小的可形成发夹结构的 mRNA 前体加工而来,主要在转录后水平上抑制基因的表达^[1]。20 世纪 90 年代, Ambros 和 Reinhart 领导的实验小组在线虫中分别发现 miRNA 家族的 2 个最初成员 lin-4^[2] 和 let-7^[3],之后,科学家通过分子克隆和生物信息学等方法,已在动物、植物、病毒及单细胞生物莱茵衣藻等生物体中鉴定出几千种保守 miRNAs^[4]。并且,随着深度测序技术在 miRNA 测序中的应用,miRNA 发现的速度越来越快,在 miRBase(Release 16.0)所登记的 miRNAs 数据库中,成熟的 miRNAs 有 15 172 种(<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>)。

作为果蔬采后生理与分子生物学研究的模式材料,番茄是目前研究植物 miRNA 的重点材料之一。2008 年, Moxon 等人用深度测序技术在番茄果实中得到大量 miRNA 序列^[5],该实验室也通过深度测序技术(Solexa 技术)^[6]得到大量不同成熟时期的 miRNA 序列,这些数据对于研究 miRNA 在果实成熟衰老过程中的作用具有重要的意义。但是,如此多的 miRNA 序列,也给 miRNA 的验证带来了很大的挑战。之前较为普遍的验证方式为基因芯片、Northern 杂交由于成本高、操作复杂,不适用深度测序结果大规模的检测。而且人们通过深度测序技术得到越来越多的 miRNA,尤其是物种特有的新 miRNA 的发现,这种新 miRNA 具

有相对不保守以及拷贝数低的特点^[7-8]。基因芯片和 Northern 杂交这 2 种检测方法的灵敏度和特异性都不能很好的满足这种 miRNA 的检测,这些都为 miRNA 的验证带来很大的挑战。因此,选择一种可以使用 miRNA 深度测序结果验证的方法显得尤为重要。2005 年,吴荣梅等人首次为 miRNA 设计颈环引物^[9],采用 loop RT-PCR 的方法验证 miRNA 的表达获得成功,这种方法因操作简单、特异性强、灵敏度高,在 miRNA 验证领域也到了认可和使用。

现利用颈环引物的方法验证番茄果实中的 miRNA 159 和 miRNA 168,此方法成本低,操作简单,适用于大量检测 miRNA 是否存在的情况。同时,对这种方法得到的 miRNA 159 片段结果进行分析,即对得到的片段进行测序,确定了这种方法的可靠性,并分析了这种方法的使用范围和条件。

1 材料与方法

1.1 试验材料

取番茄品种‘Ailsa Craig’的绿熟期果肉新鲜组织,经液氮速冻后存储于-80℃冰箱保存备用。试剂:植物 RNA 提取试剂盒购自 CWBZO,胶回收试剂盒购自 Biotake,逆转录酶购自 TaKaRa, Taq 酶购自 Trans 公司;RT-PCR 引物购自上海生物公司,其它药品、试剂为常规国产分析醇。所用的试剂为新开试剂,用灭菌的 0.1% DEPC 水配置,塑料耗材均需预先用 DEPC 水处理 12 h 以上,然后 120℃高温灭菌;研钵、试剂瓶等物品经 200℃高温烘烤 4 h,避免 RNase 的污染。

1.2 试验方法

1.2.1 番茄果实总 RNA 提取、消化 按照试剂盒说明书严格进行试验操作,采用 50 μL 的消化体系,取 20 μL DEPC 水溶解,1.5%琼脂糖检测,5 μL 点样。

1.2.2 MiRNA 反转录得到 cDNA Stemloop 逆转录体系(20 μL),RNA 模板 1 μL,其中颈环引物 RTprimer 序列:GTCTGATCCAGTGCAGGGTCCGA

第一作者简介:马远征(1987-),女,在读硕士,研究方向为食品生物技术。

责任作者:朱本忠(1975-),男,副教授,现主要从事食品生物技术方面的研究工作。E-mail:zlbz@cau.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30972037)。

收稿日期:2011-03-30

GG TATTCGCACTGGATACGACTAGAGC。逆转录反应条件: 16℃ 30 min, 60 个循环, 每个循环分别为 30℃ 30 s, 42℃ 30 s, 50℃ 1 s。

1.2.3 脉冲 PCR 对 miRNA 进行扩增 PCR 体系 (20 μ L), RT 产物 1 μ L; Forward Primer: GGCCGCTT TGG ATTGAAGGGA; Universal Primer: GTGCAGGGT CCGAGGT; 脉冲 PCR 反应条件: 94℃ 2 min, 后面是 30 个循环, 每个循环都有 94℃ 15 s, 60℃ 1 min。

1.2.4 检测、回收目的条带 点样量为 5 μ L, 4% 琼脂糖凝胶检测。

1.2.5 目的条带连接到 T 载体, 测序 将目的条带回收, 连接到 T 载体, 转到大肠杆菌感受态中, 选择具有目的条带的菌落, 摇菌, 送到上海生工测序公司测序。

1.2.6 测序结果比对 将得到的转化成功的菌液送到上海生工公司北京测序部测序, 结果用 DNAMAN 软件分析得到。

2 结果与分析

2.1 番茄果实总 RNA 提取、消化

从绿熟期的番茄果实中提取 RNA, 消化, 结果如图 1。从图 1 可看出, 2 条 RNA 条带清晰, 而且 28 s 是 18 s 亮度的 2 倍, 证明 RNA 质量没有问题; 5 s 条带机会没有, 说明 RNA 没有发生降解; 点样孔中没有亮带污染, 证明提取的 RNA 中没有蛋白质杂质的污染; 图 1 中没有基因组条带, 证明 RNA 消化得完全, 可以用于下一步 PCR 检测。

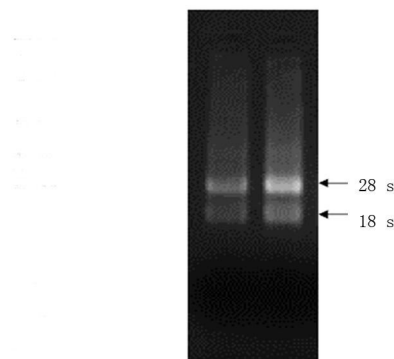


图 1 番茄果实总 RNA 消化后琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Total RNA of tomato fruit

2.2 Stemloop 扩增 miRNA 159 以及 miRNA 168 结果分析

采用 stemloop 的方法对番茄果实中 miR159 和 miR168 进行验证。从图 2 和图 3 中的结果可看出, 都有大小为 60 bp 左右的目的片段, 但是不可避免的也出现了其它大小的条带, 所以, 下一步要分离出 60 bp 的条带测序, 以验证该试验得到的 60 bp 的条带为目的条带。

2.3 重新调整 miRNA159 的退火温度进行 PCR

为了避免因反应条件不适导致的杂条带的产生, 对 miR159 扩增时采用梯度 PCR, 结果如图 4。从图 4

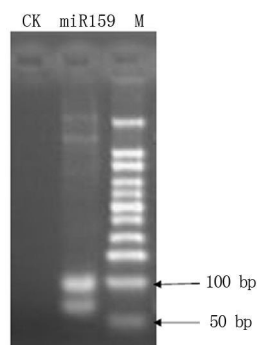


图 2 MiRNA159 脉冲 PCR 结果

Fig. 2 PCR analysis of miRNA 159

注: CK 为空白对照 M 为 Marker; 50 bp plus DNA Ladder 最小的 2 条条带大小分别为 50 bp 和 100 bp。图 3 同。

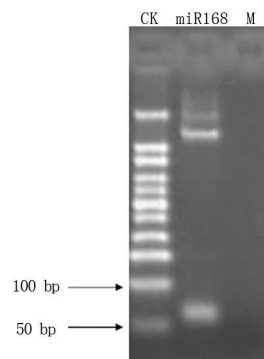


图 3 MiRNA168 脉冲 PCR 结果

Fig. 3 PCR analysis of miRNA 168

中可看出, 不同退火温度下 miRNA159 的 PCR 的结果总是有 2 条条带, 把这 2 个不同大小的条带切下来, 分别胶回收。胶回收得到的片段分别连接在 T-easy 载体上, 涂板, 菌落 PCR 验证是否转入, 以便测定 2 条条带的序列。

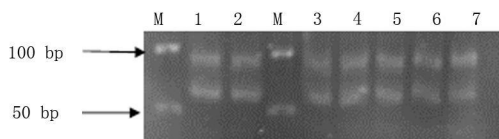


图 4 MiRNA159 不同退火温度 (即梯度 PCR)

脉冲 PCR 结果

Fig. 4 Gradient PCR analysis of miRNA 159

注: 图中不同数字代表不同的退火温度, 1 为 59.9, 2 为 60.6, 3 为 61.3, 4 为 62.1, 5 为 62.8, 6 为 63.4, 7 为 63.8。

2.4 菌落 PCR 结果

对培养基上长出的单个菌落进行 PCR 验证, 看目的条带是否转入到载体上, 结果如图 5 和图 6。从 2 张图片上可看出, 大小相符的目的片段已经转入到 T-easy 载体上, 并且通过转化进入大肠杆菌菌体内。

2.5 测序结果

将已经转入目的条带的大肠杆菌菌液拿去测序,

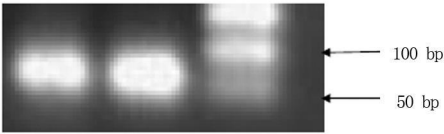


图 5 60 bp 左右小片段菌落 PCR 结果
Fig.5 PCR analysis of band of 60 bp



图 6 100 bp 左右小片段菌落 PCR 结果
Fig.6 PCR analysis of band of 100 bp

测序经 DNAMAN 软件分析结果如图 7。与根据 miRNA 序列设计的引物比对的结果,完全匹配,证明 PCR 过程没有出现差错。60 bp 左右小片段一直不能做出测序结果,分析原因可能和 60 bp 的片段会自发形成颈环结构从而影响测序有关。

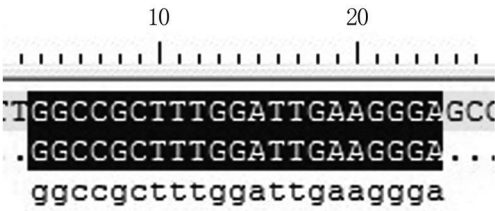


图 7 100 bp 左右小片段测序结果
Fig.7 Sequencing analysis of band of 100 bp

3 结论与讨论

从脉冲 PCR 结果来看,能够通过颈环引物扩增出需要的目的条带,以检测特异 miRNA 的存在,虽然试验中没有直接得到 60 bp 的目的条带测序结果,但是 PCR 的特异性和正确性是可以肯定的,此点从 100 bp 的测序结果可看出。至于所需要的 60 bp 的目的条带一直无法得到测序结果,原因可能是 60 bp 的条带可以自发形成颈环结构,对测序过程造成很大的影响,而

且目的片段本身就小,这更加增加了测序的难度。从试验中可看出,Stemloop 检测 miRNA 的方法与之前使用普遍的基因芯片相比,不需要太高的成本,适用于大规模的 miRNA 的检测;与基因芯片、Northern 杂交 2 种方法相比,特异性高,因为每条 miRNA 都有 1 个特异的引物;与 Northern 杂交相比,操作简单,不需要分离小片段的 RNA,既减少了操作步骤,又有效地避免了验证过程中 miRNA 的降解。因此,用 stemloop 检测 miRNA 的存在,具有低成本、特异性高、操作简单的特点,适用于大规模的 miRNA 的检测。

虽然,该试验能够验证出大小正确的片段,但同时也出现了其它的条带,但验证 miRNA 159 时,一直都无法通过改变条件消除的 100 bp 的条带,很有可能是 miRNA 的前体。因此,这种方法不适用于实时定量 PCR 检测表达差异,但是如果验证某个 miRNA 的存在是没有问题的,而且这种方法成本较低,可以作为大规模检测的初筛方法。

(该文的作者还有王云香和罗云波,工作单位同第一作者。)

参考文献

[1] Zarnore P D, Haley B. The big world of small RNAs[J] . Science, 2005 309: 1519-1524.
[2] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14 [J] . Cell 1993, 75: 843-854.
[3] Rajagopalan R, Vauthier H, Trejo J, et al. A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in Arabidopsis thaliana[J] . Genes & Dev, 2006, 20: 3407-3425.
[4] Axtell M J, Bartel D P. Antiquity of microRNAs and their targets in land plant[J] . Plant Cell, 2005, 17: 1658-1673.
[5] Moxon S, Jing R C, Szitty G, et al. Deep sequencing of tomato short RNAs identifies microRNAs targeting genes involved in fruit ripening[J] . Genome Res, 2008 18: 1602-1609.
[6] Bentley D R. Whole-genome resequencing [J] . Currentr. Opinion. Genet, 2006, 16: 545-552.
[7] Fahlgren N, Howell M D, Kasschau K D, et al. High-throughput sequencing of Arabidopsis microRNAs: Evidence for frequent birth and death of miRNA genes[J] . Plos One, 2007, 2: 216-219.
[8] Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, et al. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs[J] . Plant Methods, 2007, 3: 12.

The Research of A Method For Micro RNAs' Quick Validation in Tomato Fruit

MA Yuan-zheng, LIU Hai-ping, ZUO Jin-hua, FU Da-q, CHI Li-hong, ZHU Ben-zhong, WANG Yun-xiang, LUO Yun-bo
(College of Food Science and Nutrition Project, China Agricultural University, Beijing 100083)

Abstract: The paper used tomato as material, and a stem-loop sequence as the reverse transcription primer to amplify miRNA 159 and miRNA 168. Analyzed the bands which was the right size, made sure that it's the right bands we wanted. So this method which cost less and operate simply ould make a great help for the research of the characters and functions of miRNA.

Key words: miRNA; deep sequence; loop RT-PCR; validation