

大豆 miR-171 基因家族的进化与功能分析

王艳芳¹, 赵彦宏², 张 萍¹, 周瑞莲¹

(¹鲁东大学生命科学学院, 山东烟台 264025; ²鲁东大学农学院, 山东烟台 264025)

摘要: 运用生物信息学方法在 miRBase 搜索大豆 miR-171 (gma-miR-171) 基因家族的序列, 分析 gma-miR-171 序列的进化特征并预测其靶基因。结果表明, 在 miRBase 中共搜索到 21 条 gma-miR-171 基因家族序列。序列分析发现, gma-miR-171 基因家族序列保守性较差, 只有 2 个碱基完全保守。对 gma-miR-171 基因进行定位, 21 个成员分散在 12 条染色体上, 其中 Chr06 上 gma-miR-171 基因最多, 共 4 个。进化分析表明, 位于同一条染色体上的 gma-miR-171 基因没有表现出较近的亲缘关系。靶基因预测获得 14 个 gma-miR-171 基因家族的靶基因, 包括蛋白激酶、磷酸酶、输出蛋白、转录因子等, 说明 gma-miR-171 基因家族在大豆中具有广泛的调控功能。

关键词: 大豆; miR-171; 基因家族; 靶基因预测

Molecular Evolution and Targets Prediction of gma-miR171 Gene Family in Soybean

WANG Yan-fang¹, ZHAO Yan-hong², ZHANG Ping¹, ZHOU Rui-lian¹

(¹School of Life Science, Ludong University, Yantai Shandong 264025; ²School of Agriculture, Ludong University, Yantai Shandong 264025)

Abstract: The miR-171 gene family of soybean (gma-miR-171) was searched in miRbase using bioinformatics method in this study. Molecular evolution of gma-miR-171 gene family was analyzed and their target genes were predicted. The results showed that, 21 sequences of gma-miR-171 gene family were found in miRBase. Sequences analysis revealed that the gma-miR-171 gene family had low conservation. Only 2 bases were conserved completely. Gene location suggested that 21 gma-miR-171 genes were distributed in 12 chromosomes. Among them, Chr06 had the most gma-miR-171 genes distribution, and there were 4 gma-miR-171 genes locating in Chr06. Evolution analysis showed that the genes located in the same chromosome did not have nearer phylogenetic relationship than other gma-miR-171 genes. Gene predicting found 14 target genes of gma-miR-171 gene family, including proteinase, phosphatase, exportin, and transcription factor. These findings suggest that gma-miR-171 gene family plays significant roles in soybean.

Key words: soybean; miR-171; gene family; target gene predicting

MicroRNA (miRNA) 是一类广泛存在于动植物体内的小分子非编码 RNA, 长度约为 18 ~ 25 个核苷酸^[1], 在植物中 miRNA 主要通过序列互补方式介导靶 mRNA 的降解从而抑制靶基因的表达^[2]。自 1993 年第一个能时序调控胚胎后期发育的线虫 miRNA 基因 *lin-4* 发现以来^[3], 随着高通量测序技

术的成熟, 越来越多的 miRNA 被发现, 目前 miR-Base 数据库 (Release 21) 中已公布植物 miRNA 成熟序列 6000 多条^[4]。miRNA 的功能研究也受到广泛重视, 植物 miRNA 在植物的生长发育、逆境胁迫响应等方面都具有重要的调控作用^[5-6]。

多数植物 miRNA 基因是保守的^[7]。不同植物

收稿日期: 2015-07-21 修回日期: 2015-07-31 网络出版日期: 2015-08-011

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20150811.1554.004.html>

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31201199); 山东省自然科学基金项目 (ZR2013CL013); 水稻生物学国家重点实验室开放项目 (120201)

第一作者研究方向为植物遗传育种。E-mail: wyf863@126.com

通信作者: 赵彦宏, 研究方向为植物遗传育种。E-mail: zyhbob@163.com

中的保守 miRNA 基因家族数量差异较大,可能通过基因剂量效应和表达的时空差异而发挥着不同的调控作用^[8]。植物 miR-171 基因家族是高度保守的 miRNA 之一^[9-10],miRBase 数据库(Release 21)中共收录了 38 种植物的 miR-171 基因^[4],其中大豆 miR-171(gma-miR-171)基因家族成员最多,多达 21 个^[4,11],说明 gma-miR-171 基因家族在大豆中可能形成了较复杂的调控网络。S. Subramanian 等^[12]从大豆根系成功分离到 4 个 gma-miR-171 基因,R. Chen 等^[13]从野生大豆中分离到一个 miR-171 基因,由于当时大豆基因组未完成测序,功能分析受限,并没有对大豆 miR-171 基因的功能进行分析报道;2012 年,M. Shamimuzzaman 等^[14]从不同发育阶段的大豆种子中分离到 miR-171 基因,同时发现了 miR-171 基因的 2 个靶基因:蛋白络氨酸激酶和甲基转移酶。gma-miR-171 基因家族成员如此众多,其功能研究却相对较少,目前未见系统报道。本文使用 CLustalw2^[15]、MEGA^[16]等序列分析软件对 gma-miR-171 基因家族的序列和进化过程做了分析,并用 psRNATarget 等 3 个在线软件对 gma-miR-171 基因家族的靶基因进行预测,分析 gma-miR-171 基因家族的功能,为 miR-171 基因家族的功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 数据来源

从 miRBase (<http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl>)中获得 21 条大豆 gma-miR-171 基因前体序列及其成熟序列。

1.2 多序列比对

用 CLustalw2 在线软件对所搜集到的 gma-miR-171 成熟序列进行多序列对比。

1.3 gma-miR-171 染色体定位

采用 NCBI 数据库 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)程序,用 gma-miR-171 基因家族前体序列对大豆基因组数据库进行搜索(BLAST Assembled RefSeq Genomes),以确定 gma-miR-171 在基因组中的位置。

1.4 进化树构建

采用 MEGA 6.0 软件,基于距离参数的邻接法(NJ, neighbor-joining)构建 gma-miR-171 的系统进化树,重复值设定为 1000。

1.5 靶基因的预测

选用 3 个适用于植物靶位点分析的在线软件

miRU (<http://www.miruvntrplus.org/MIRU/index.faces>)、PatScan (<http://secondarymetabolites.org/>)和 psRNATarget (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>)对 gma-miR-171 基因家族的靶基因进行预测。程序运行时参数为默认值。

2 结果与分析

2.1 gma-miR-171 基因家族序列分析及基因定位

在 miRBase (Release 21) 中搜索 gma-miR-171 序列,共搜到 21 条 gma-miR-171 基因同源序列(表 1)。从表 1 可以看出,21 条 gma-miR-171 基因家族成熟序列中,除了 gma-miR171b 碱基数为 23 个、gma-miR171i 碱基数为 20 个外,其他 19 条 gma-miR-171 序列碱基数均为 21 个。采用 CLustalw2 在线软件进行序列对比发现,gma-miR-171 基因家族序列碱基保守性差异较大,有 2 个碱基完全保守,6 个碱基保守性较高,其他碱基保守性较低,出现这种差异可能与 miRNA 的进化过程有关。另外,gma-miR-171 基因家族在进化过程中有少数基因发生了碱基缺失或插入的情况,导致 gma-miR-171 基因家族成员间的成熟序列长度产生变化。

以 gma-miR-171 的前体序列作为查询序列,对大豆基因组 DNA 进行 BLAST 搜索,从而确定各个序列在基因组中的位置(表 1)。结果显示,21 个 gma-miR-171 基因分散在 12 条大豆染色体上,其中 Chr06 上 gma-miR-171 基因最多,共有 4 个,分别为 gma-miR171h、gma-miR171i、gma-miR171s 和 gma-miR171t;Chr12 和 Chr 13 上各有 3 个 gma-miR-171 基因;而 Chr04 号和 Chr17 上则各有 2 个 gma-miR-171 基因,其余 7 个 gma-miR-171 基因分别位于 7 条不同染色体上。所有 gma-miR-171 基因家族成员都只有一个拷贝,gma-miR-171 基因家族在基因组中的定位结果还表明 21 条 gma-miR-171 基因都位于基因间隔区。

2.2 gma-miR-171 基因家族系统进化树分析

以 gma-miR-171 基因家族的 21 条成熟序列为基础,构建进化树并进行进化分析。采用 MEGA 6.0 软件构建基于距离参数法(NJ, neighbor-joining)的系统进化树(图 1)。

从图 1 可以看出,整个进化树可分为 5 个分支,21 个 gma-miR-171 基因在进化树上的分布较分散,每个分支有 3~6 个 gma-miR-171 基因,遗传距离差距不大,可能在进化过程中有多个 gma-miR-171 基因同时出现在大豆基因组中。位于同一条染色体上

表 1 gma-miR171 基因家族成熟序列及其染色体定位

Table 1 Mature sequence and chromosome location of miR-171 gene family

miRNA 名称 Name of miRNA	成熟序列 Mature sequence	染色体定位 Chromosome location
gma-miR171a	UGAGCCGUGCCAAUAUCACGA	Chr12:8443016 ~ 8443207
gma-miR171b	ACGGCGUGAUAUUGGUACGGCUC	Chr04:46988579 ~ 46988670
gma-miR171c	AGAUAUUGGUGCGGUUCAAUC	Chr07:43679648 ~ 43679751
gma-miR171d	UGAUUGAGUCGUGUCAUAUUC	Chr01:49100269 ~ 49100368
gma-miR171e	UGAUUGAGCCGUGCCAAUAUC	Chr05:41564656 ~ 41564745
gma-miR171f	UGAUUGAGCCGUGCCAAUAUC	Chr15:8564113 ~ 8564202
gma-miR171g	UGAUUGAGCCGUGCCAAUAUC	Chr16:5347836 ~ 5347925
gma-miR171h	AUUGAGACGAGCCGAAUCAAU	Chr06:10859561 ~ 10859711
gma-miR171i	AUAAGAAAGCAAUGCUCAAA	Chr06:48920612 ~ 48920762
gma-miR171j	UAUUGGCCUGGUUCACUCAGA	Chr02:4014001 ~ 4014153
gma-miR171k	CGAUGUUGGUGAGGUUCAAUC	Chr13:26271135 ~ 26271232
gma-miR171l	CGAUGUUGGUGAGGUUCAAUC	Chr17:9101701 ~ 9101789
gma-miR171m	UUGAGCCGCGUCAAAUUCUCA	Chr12:8398817 ~ 8398949
gma-miR171n	UUGAGCCGCGUCAAAUUCUUA	Chr12:35489074 ~ 35486207
gma-miR171o	AGAUAUUGGUACGGUUCAAUC	Chr13:30650791 ~ 30650892
gma-miR171p	UUGAGCCGCGUCAAAUUCUUA	Chr13:39325495 ~ 39325626
gma-miR171q	UUGAGCCGUGCCAAUAUCACA	Chr17:1007461 ~ 1007569
gma-miR171r	CGAGCCGAAUCAAUACCACUC	Chr04:46988892 ~ 46988993
gma-miR171s	CGAGCCGAAUCAAUACCACUC	Chr06:10859290 ~ 10859391
gma-miR171t	UUGAGCCGCGUCAAAUUCUCA	Chr06:4896774 ~ 4896890
gma-miR171u	UGAUUGAGCCGUGCCAAUAUC	Chr08:931796 ~ 921897

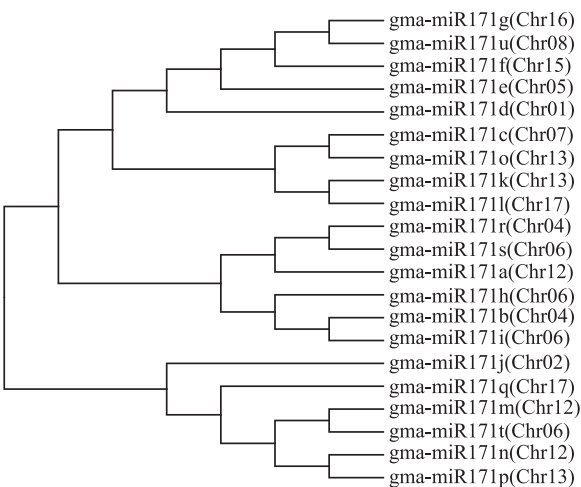


图 1 gma-miR-171 基因家族的系统进化树

Fig.1 Phylogenetic tree of gma-miR-171 gene family

的 gma-miR-171 基因(如 Chr06 上的 4 个 gma-miR-171 基因、Chr12 上的 3 个 gma-miR-171 基因等)没有表现出较近的亲缘关系,据此推测相同染色体上

的 gma-miR-171 基因不是经过简单的串联重复形成。关于 miR-171 基因家族的进化,有必要结合其他物种进行深入研究。

2.3 靶基因的预测

为了提高预测的准确性,选用 3 种在线软件 psRNATarget、miRU 和 PatScan 同时进行 gma-miR-171 基因家族的靶基因预测,把 3 种软件都能预测到的靶基因作为候选靶基因。结果表明,3 种软件共预测到大豆 miR-171 基因家族的靶基因 14 类(表 2)。从表 2 可以看出,gma-miR-171 基因家族靶基因的功能涉及范围较广,有蛋白激酶、磷酸酶、输出蛋白、生长调节因子、转录因子等。

3 讨论

目前,已在 38 个植物物种中发现 miR-171 基因,随着测序技术的成熟和研究的深入,可以肯定,会有更多的 miR-171 基因被挖掘。miR-171 基因如此丰富,说明 miR-171 基因家族是高度保守的一类

表2 gma-miR-171 基因家族靶基因预测

Table 2 Predicted target genes of gma-miR-171 gene family

靶基因名称	基因功能
Name of target gene	Function of gene
aspartic proteinase	天冬氨酸蛋白酶
Serine/threonine protein phosphatase	丝氨酸/苏氨酸磷酸酶
N-acetylglucosamine transferase family protein	转移酶蛋白家族
1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	氧化酶
ran-binding family protein	ran 结合蛋白家族
exportin-7	输出蛋白
GRAS family transcription factor	GRAS 家族转录因子
scarecrow-like protein	调控花和根系的发育
serine/threonine-protein kinase	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶
cysteine-rich receptor-like protein kinase	半胱氨酸蛋白激酶
beta-glucosidase	葡糖苷酶
sucrose synthase	蔗糖合酶
ATP-dependent zinc metalloprotease	金属蛋白酶
LOB domain-containing protein	LOB 结构域蛋白

miRNA,印证了 miRNA 家族在植物中的保守性。据此可以推断 miR-171 基因在植物中具有广泛的调控功能,值得研究人员去关注。gma-miR-171 基因家族成员间序列保守性较低,可能与 gma-miR-171 基因形成方式的复杂多样有关。相同染色体上 gma-miR-171 基因没有出现在进化树的相同分支上推断 gma-miR-171 基因以串联重复方式形成的较少,与水稻 miR156 基因家族^[17]、miR395 基因家族^[18]的串联重复的进化方式不同,表明植物 miRNA 可能存在多种进化方式。

大豆是目前 miRBase 数据库 (Release 21) 中 miR-171 基因家族成员最多的物种^[4,10],通过 gma-miR-171 基因的靶基因预测,预测到了许多靶基因,包括转移酶蛋白家族、ran 结合蛋白家族和 LOB 结构域蛋白等,说明 gma-miR-171 基因家族在大豆中参与许多功能的调控。研究中还发现,gma-miR-171 基因的部分靶基因与报道过的拟南芥^[19]、高山松^[20]和杨树^[11]等植物的 miR-171 基因有相同的靶基因,如 GRAS 家族转录因子,而 GRAS 家族转录因子在植物中的功能非常广泛,可调控植物的生长发育、激素信号转导等,可以推断 gma-miR-171 基因家族的调控功能也极其广泛;J. Curaba 等^[21]的研究结果表明,miR-171 在单子叶植物大麦中也可以调控 *SCL6-II* 等基因,与拟南芥的功能相似。这说明 gma-miR-171 基因家族的部分功能在物种间表现出较高

的保守性。

由于基因功能研究的限制,很多 gma-miR-171 基因的靶基因无法给出准确的注释。但是,随着研究的深入,会有更多的 miR-171 基因家族的功能被发掘。

参考文献

- [1] 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(5): 843-854
- [2] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297
- [3] Reinhart B, Slack F, Basson M, et al. The nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *C. elegans* [J]. *Nature*, 2000, 403(6772): 901-906
- [4] <http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl> (Release 21)
- [5] Chen X M. Small RNAs and their roles in plant development [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2009, 25: 21-44
- [6] Llave C, Xie Z X, Kasschau K D, et al. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA [J]. *Science*, 2002, 297(5589): 2053-2056
- [7] Arteaga-Vázquez M, Caballero-Pérez J, Vielle-Calzada J P. A family of microRNAs present in plants and animals [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(12): 3355-3369
- [8] Li A L, Mao L. Evolution of plant microRNA gene families [J]. *Cell Res*, 2007, 17(3): 212-218
- [9] Zhang B H, Pan X P, Cannon C H, et al. Conservation and divergence of plant microRNA genes [J]. *Plant J*, 2006, 46(2): 243-259
- [10] 魏强,梁永宏,李广林. 植物 miRNA 的进化 [J]. *遗传*, 2013, 35(3): 315-323
- [11] 刘志祥,曾超珍,曾渭贤,等. 杨树 MIR171 基因家族进化与功能分化研究 [J]. *植物遗传资源学报*, 2014, 15(2): 313-319
- [12] Subramanian S, Fu Y, Sunkar R, et al. Novel and nodulation-regulated microRNAs in soybeans roots [J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 160
- [13] Chen R, Hu Z, Zhang H. Identification of microRNAs in wild soybean (*Glycine soja*) [J]. *Integr Plant Biol*, 2009, 51(21): 1071-1079
- [14] Shamimuzzaman M, Vodkin L. Identification of soybean seed developmental stage-specific and tissue-specific miRNA targets by degradome sequencing [J]. *BMC Genomics*, 2012, 13: 310
- [15] <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>
- [16] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2013, 30(12): 2725-2729
- [17] Wang S, Zhu Q H, Guo X Y, et al. Molecular evolution and selection of a gene encoding two tandem microRNAs in rice [J]. *FEBS Lett*, 2007, 581(24): 4789-4793
- [18] Guddeti S, Zhang D C, Li A L, et al. Molecular evolution of the rice miR395 gene family [J]. *Cell Res*, 2005, 15(8): 631-638
- [19] Wang L, Mai Y X, Zhang Y C, et al. MicroRNA171c-targeted SCL6-II, SCL6-III, and SCL6-IV genes regulate shoot branching in *Arabidopsis* [J]. *Molecular Plant*, 2010, 3(5): 794-806
- [20] 张曼曼. 高山松 microRNA171a 的功能研究 [D]. 新乡:河南师范大学, 2014
- [21] Curaba J, Talbot B, Li Z, et al. Over-expression of microRNA171 affects phase transitions and floral meristem determinancy in barley [J]. *BMC Plant Biol*, 2013, 13: 6