

普通番茄和多毛番茄中 MicroRNA 的筛选及鉴定

李乾楠, 郭广君, 高建昌, 王孝宣, 国艳梅, 杜永臣*

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

植物的 MicroRNA (miRNA) 是一类长度为 21 个核苷酸左右的内源 RNA 分子, 参与植物的多个生命过程, 如生长发育、抗逆生理等, 起着重要的调控作用。多毛番茄是重要的野生资源, 具有较强的抗病、抗逆、抗虫性以及较高的干物质含量。利用 miRNA 大规模测序技术探寻普通番茄和多毛番茄在 miRNA 调控方面的异同, 将能在新的层面上研究番茄的生长发育调控机制。

试材为普通番茄 9706 (中国农业科学院蔬菜花卉研究所选育的高代粉果品系) 和多毛番茄 PI134417 (引自美国农业部)。定植 30 d 后取样, 液氮速冻, 保存于 -70 °C 备用。

采用 RNAiso reagent (TaKaRa) 提取 RNA, 经 15% 聚丙烯酰胺胶分离回收, 然后两端加上特异接头, 经反转录获得 cDNA, 经 Solexa 测序, 获得 sRNA 库 (华大生物技术公司)。sRNA 序列经过去除接头序列、低质量序列及污染序列获得 clean reads。分别对普通番茄和多毛番茄的 clean reads 进行分析。首先去除 rRNAs, tRNAs, snRNAs 和 snoRNAs, 利用 Blastn 与 miRBase 17.0 进行已知 RNA 比对。未能匹配上的, 将其定位于 SL2.30 上, 进行新 miRNA 的预测。利用 Tomato Functional Genetics Database (<http://ted.bti.cornell.edu/>) 进行靶基因预测。

通过测序, 在栽培番茄和多毛番茄中分别获得了 17 077 223 和 17 834 355 个原初序列, 经过去除多余序列, 分别获得 16 282 007 和 17 115 875 个 clean reads。对这些序列分析, 发现多数序列长度在 18 ~ 25 个核苷酸之间。

通过与已知 RNA 库比对, 分别在栽培番茄和多毛番茄中鉴定出 218 和 236 个已知 RNA, 分别有 163 和 179 个属于 21 种保守的 miRNA 家族, 其他的属于 30 种非保守的 RNA。在非保守的 miRNA 家族中, 有 18 种在两份番茄材料中一样, 两份材料中各鉴定出 12 种特异 miRNA。

对两份材料中各自特异的 12 种非保守的 miRNA 进行了靶基因预测。发现这些 miRNA 靶基因的功能为转录因子、钙调素结合转录激活因子、蛋白激酶以及逆境响应蛋白等。

形成稳定的发夹结构是产生 miRNA 所必须的, 基于此, 预测出 20 个新的 miRNA。同时预测了这些 miRNA 的前体结构。

关键词: 番茄; 多毛番茄; microRNA; miRNA; 测序

中图分类号: S 641.2

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) S-2570-01

收稿日期: 2011-08-26

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30900987)

* 通信作者 (E-mail: yongchen.du@mail.caas.net.cn; Tel: 010-82109515)