桑寄生种子中抗寒microRNAs的鉴定

华大智造Small RNA建库与DNBSEQ测序技术赋能miRNA研究

广西药用植物园魏树根团队利用华大智造MGIEasy Small RNA建库技术和DNBSEQ测序技术，针对当前桑寄生种子在低温胁迫下易丧失生存发育能力问题进行研究，对桑寄生种子中特异性响应低温胁迫的miRNA进行了分析和鉴定[1]。相关成果以Identification of MicroRNAs in *Taxillus chinensis* (DC.) Danser Seeds under Cold Stress为题于2021年发表于*BioMed Research International* 杂志。

推荐应用：农业基因组学

推荐机型：MGISEQ-2000RS

- **样本RNA起始量低**

  可将10 ng-1 μg总RNA样本制备成高质量小RNA测序文库。

- **样本类型兼容性高**

  桑寄生种子可作为植物样本进行实验。该建库技术适用于多物种的不同类型样本，且在所有样本类型上保持稳定的性能。

- **适配自动化**

  该试剂盒可适配华大智造自动化样本处理系统从而实现高效、快捷的实验流程。

- **测序数据产出高效且质量高**

  DNBSEQ测序技术具有高准确性，低重复序列率以及低标签跳跃等重要特性。

背景介绍

桑寄生(学名：*Taxillus chinensis* (DC.) Danser)是一种寄生植物，同时也是一种古老的中药，可用于治疗风湿、高血压、中风等疾病[2]。然而，桑寄生植物繁殖能力较低，很大一部分原因在于其种子对温度十分敏感，在低于0°C条件下会迅速丧失生存发育能力。低温胁迫是影响许多植物地理分布、生长季节和产量的重要因素[3]。已有大量研究报道表明，植物中存在许多与低温胁迫响应相关的MicroRNAs(miRNA)，它们在植物抗寒调控中发挥重要功能。然而，我们对桑寄生中的低温胁迫响应的调控机制知之甚少。

miRNA是一类内源性的小的非编码RNA(18~24nt)，其通过切割信使RNA(mRNA)或在转录后抑制翻译以达到抑制蛋白表达的功能[4]。在植物中，miRNA的初级转录产物可由DAWDLE稳定，并被DCL1、HYL1、SE和D-小体中的核CBC加工为miRNA:miRNA*双体，随后被HEN1甲基化并转运到细胞质[5]。双链中的成熟miRNA，被并入AGO蛋白复合物中[6]。目前，miRBase数据库(v22.1)共收录82种植物(如水稻、玉米、拟南芥和葡萄等)的10414条miRNA和miRNA*序列。

研究描述

由于未了解桑寄生属基因组的全面信息，桑寄生属miRNA序列及其调控的研究仍然是空白。miRNA测序已被广泛应用于模型和非模型植物中识别已知的和新的miRNAs，如秋葵等植物。此前，该团队已报道了桑寄生种子响应水分流失的相关转录组信息[7]，这个转录组可以用于桑寄生种子的miRNA发现。在这项研究中，作者首先评估了在不同温度下保存不同时间的桑寄生种子的生存能力。然后对miRNA进行测序，确定了桑寄生种子中已知的和新的miRNAs以及参与抗寒过程的miRNAs。

实验方法

样本制备

从广西药用植物园内收集了100个桑寄生种子样本。经过不同冷处理温度(-20°C，-5°C，-1°C，0°C，4°C，10°C，25°C)和时间(1h，2h，3h，4h，5h，10d，20d)后使用TTC染色法(1% 2,3,5-三苯基四唑氯)进行种子活力测试[7]。用TRIzol试剂从储存在0°C条件下0h(A0)，12h (A1)，36h(A2)种子中提取总RNA(100毫克，三份)，使用Agilent Bioanalyzer 2100对总RNA数量和质量进行评价[8]。

文库构建与测序

所制备的总RNA样本取1μg使用华大智造MGIEasy Small RNA文库制备试剂盒构建小RNA文库。大致流程如下：总RNA经尿素-PAGE凝胶电泳分离，并切取对应小RNA(18-30bp)的条带。离心提取小RNA后，将其与3'腺苷酰化接头连接，然后用带barcode的逆转录引物与3'接头退火，再与5'接头进行连接，进行反转录。合成一链cDNA后，经PCR扩增15个循环并凝胶电泳切取103-115bp大小的片段产物进行纯化并使用定量。后将产物进行环化，用Qubit ssDNA Assay Kit对最终产物(单链环状DNA)进行定量。

文库制备过程较为复杂，尤其在样本量较大时耗时耗力，且容易出现加样体积误差及出错。推荐使用华大智造自动化样本制备系统完成文库构建，省去人工实验的操作，提高样本制备的稳定性，全面提升效率。

对于small RNA测序，首先通过滚环复制产生DNA纳米球(DNBs)，然后将DNB加载到测序芯片中，在DNBSEQ测序平台上完成单端50个碱基的读长测序(SE50)。

数据分析

原始数据由SOAPnuke进行处理筛选，利用miRDeep2预测之前发表的桑寄生种子转录组中可能的miRNA发夹结构。使用预测的miRNA前体作为参考来分析miRNA的表达情况[9]，将所有处理后的数据与miRBase中成熟植物miRNAs数据进行比较，选择与各miRNA家族一致的表达量最高的Read作为桑寄生属植物的miRNA序列。将已发表的桑寄生属种子转录组作为miRNA靶基因信息资源，利用psRobot，TarHunterL，TargetFinder三个软件预测差异表达的miRNA靶基因。应用Gene Ontology和KEGG pathway分析并注释这些转录组。最后利用qRT-PCR定量验证miRNA及其目的基因的表达水平。

样本采集	文库制备和测序	生信分析	结果分析
广西药用植物园收集的100个桑寄生种子样本	MGIEasy Small RNA文库制备试剂盒 基因测序仪 MGISEQ-2000RS	SOAPnuke miRDeep2 psRobot TarHunterL TargetFinder	·差异表达microRNA (DEmiRs)分析 ·miRNA靶标预测和通路分析

结果

miRNA鉴定和表达分析

桑寄生种子的miRNA具有传统miRNA结构，例如，aly-miR390a和c51122_g1_i3_15022 (图1a)，以及一些具有siRNA-like结构的miRNA(图1b),这些在桑寄生种子中具有传统结构的miRNA在冷处理12 h和36h后具有明显的激活和抑制表现(表1)。此次研究结果首次在低温胁迫下的桑寄生种子中鉴定到600个miRNAs。其中共鉴定出242个差异表达miRNA，分别在A0(对照)、A1(0°C冷处理12小时)和A2(在0°C冷处理36小时)中检测到224、229和223个miRNAs(TPM > 1)(图1c)。在A0、A1和A2中，分别有18、17和16个miRNAs表达量超过1000 TPM(图1d)。

miRNA	A1 vs. A0			A2 vs. A0			A2 vs. A1		
	log2FC	FDR	Regulation	log2FC	FDR	Regulation	log2FC	FDR	Regulation
miR1886	1.183	0.013	Up	1.041	0.039	Up	-0.156	0.831	NC
c55345_g4_i1_29371-3p	1.242	0.018	Up	1.010	0.081	Up	-0.237	0.764	NC
miR5067	1.062	0.032	Up	1.284	0.010	Up	0.262	0.710	NC
miR477	1.966	0.001	Up	1.552	0.026	Up	-0.373	0.646	NC
miR398_2	2.115	0.000	Up	3.057	0.000	Up	0.991	0.054	NC
miR398	1.439	0.002	Up	2.203	0.000	Up	0.815	0.097	NC
c52663_g1_i2_17575-3p	1.141	0.014	Up	2.087	0.000	Up	0.837	0.087	NC
miR5179	1.792	0.001	Up	1.717	0.003	Up	-0.014	1.000	NC
miR408	1.681	0.001	Up	3.507	0.000	Up	1.890	0.000	UP
c52663_g1_i7_17584-3p	1.232	0.013	Up	1.737	0.000	Up	0.443	0.455	NC
ath-miR779.2-3p	-1.202	0.013	Down	-1.902	0.000	Down	-0.625	0.263	NC
ath-miR2934b-5p	-5.742	0.001	Down	-5.738	0.001	Down	0.000	1.000	NC
miR156r	-1.064	0.030	Down	-1.286	0.009	Down	0.030	1.000	NC
ath-miR859-3p	-6.434	0.000	Down	-2.375	0.006	Down	4.134	0.113	NC
miR2865	-6.318	0.000	Down	-6.324	0.000	Down	0.000	1.000	NC

表1. 冷处理12 h和36h后桑寄生种子中miRNA的激活和抑制

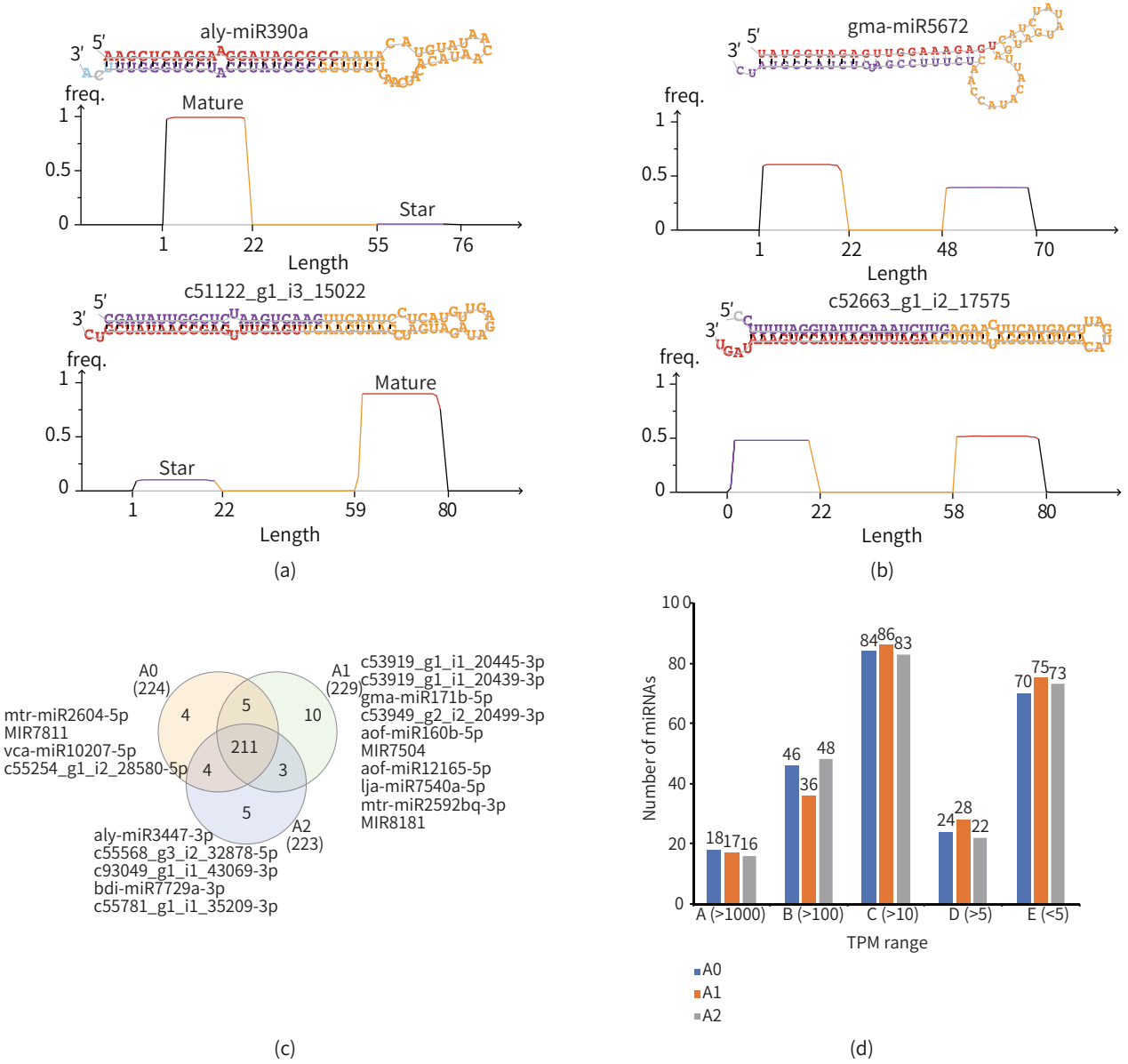

图1. 低温胁迫下桑寄生种子中发现的miRNAs。(a) miRDeep2鉴定的桑寄生miRNAs的常规结构。(b) 桑寄生种子中可能存在siRNA-like结构的miRNA。(c) 在0 °C下0 h (A0)，12 h(A1)和36 h (A2)桑寄生种子中鉴定的miRNA的韦恩图。(d) 每个样本的miRNA表达分布。

桑寄生种子中响应低温胁迫的miRNA

在响应寒冷的桑寄生种子中鉴定到103个差异表达miRNA(图2 a~d)，其中miR408在冷处理过程中上调，同时，一些差异表达miRNA在A1组中特异性存在，并且可能在冷胁迫响应早期发挥功能，如miR390a、miR160b、miR171b和miR167c，而miR408在冷处理过程中一直发挥作用(图2 e~h)。

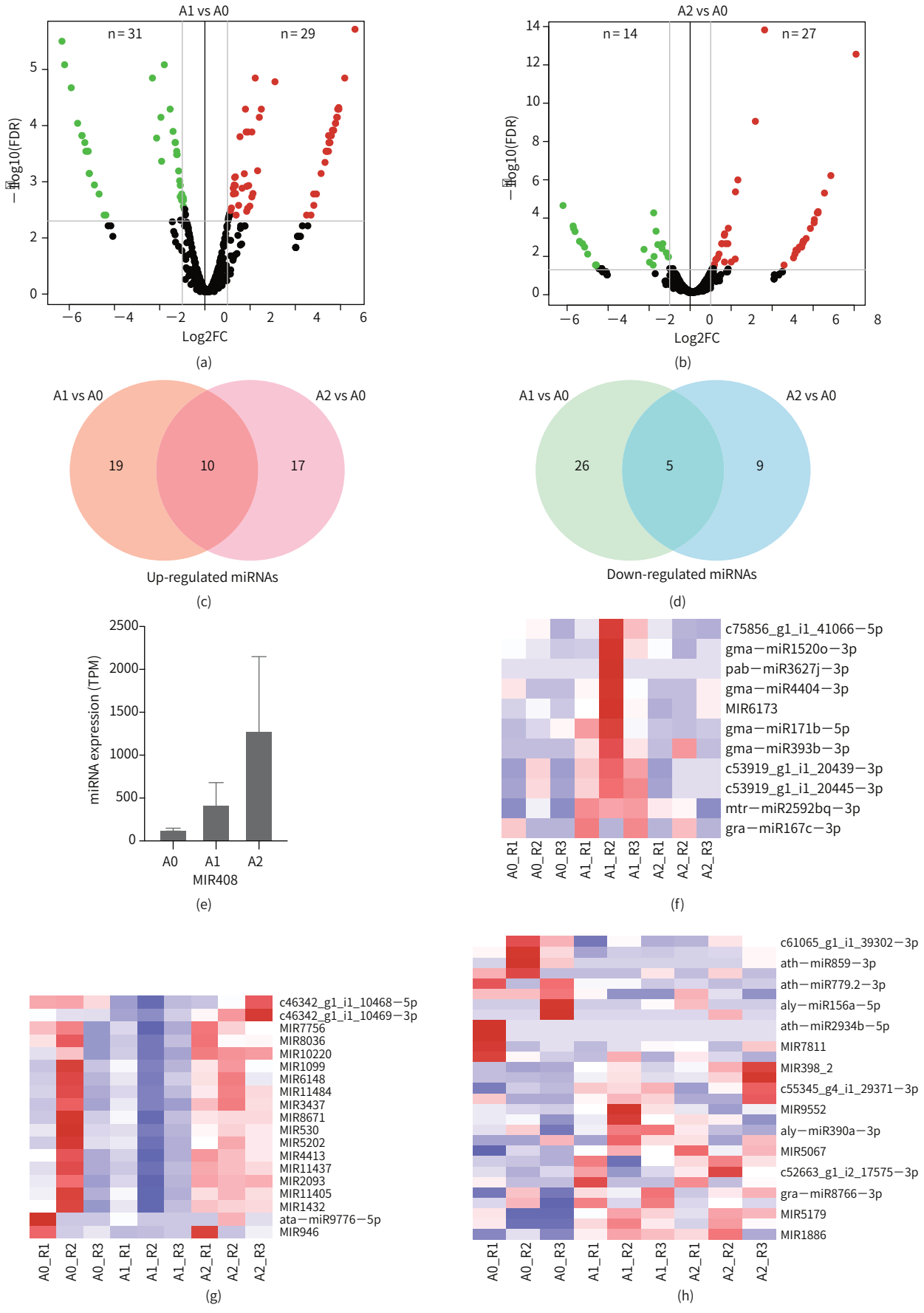

图2. 低温胁迫下桑寄生种子中发现的差异表达miRNAs

仅供研究使用，不适用于临床诊断

靶基因预测、通路分析及其调控网络

利用已发表的桑寄生属种子转录组作为信息资源，利用psRobot，TarHunterL，TargetFinder三个软件对差异表达miRNA的靶基因进行预测，获得了479个miRNA和5610个靶基因以及不同冷处理条件下相关靶基因的调控情况(表2)。靶基因预测结果表明，桑寄生种子中一些已知的冷响应基因可能受到DEmiRNAs的调控，如ICE1、UBC和多种转录因子(如WRKY和TCP)，这表明这些差异表达miRNA可能通过调控冷胁迫响应中的关键调控基因来发挥功能。接下来，我们对每个比较中发现的DEmiRs的靶基因进行了KEGG通路分析。对于大多数调控通路，A1与A0和A2与A1中DEmiRs的靶基因数量相似(图3)。然而，一些通路可能被一些只在A2中发现的DEmiRs所调节。

Type	Type	Number of miRNAs	Number of targets
Loranthus	ALL	479	5,610
	Total	53	501
A1 vs. A0	Upregulated	24	316
	Downregulated	29	185
	Total	36	216
A2 vs. A0	Upregulated	24	180
	Downregulated	12	39
	Total	55	624
A2 vs. A1	Upregulated	37	331
	Downregulated	19	293

表2. 差异表达miRNA的靶标数量

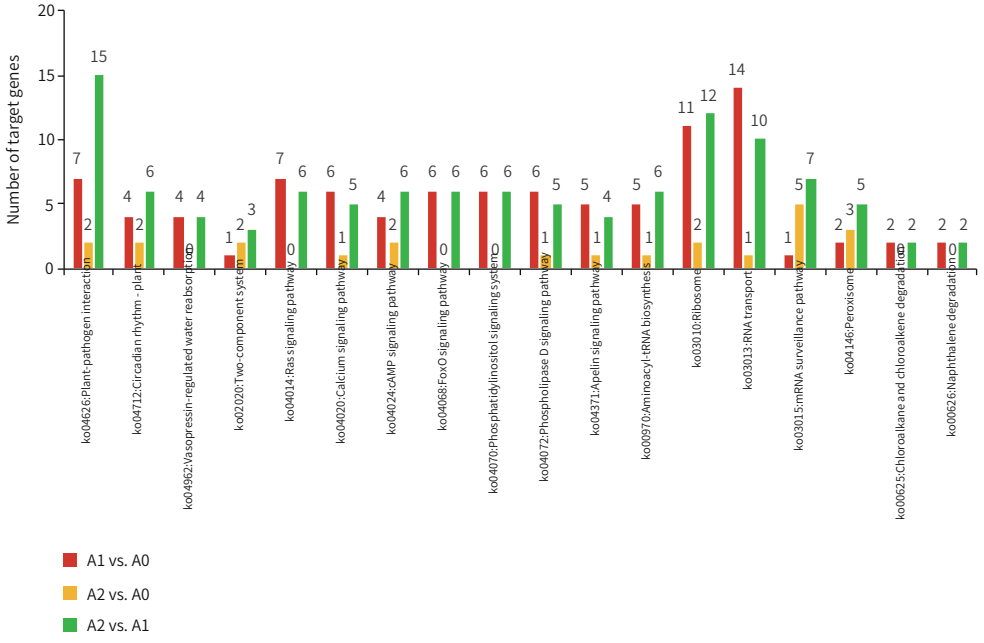

图3. DEmiRs的KEGG通路分析

关键miRNA及其调控网络

通过GO和KEGG注释这些miRNA的靶基因，基因功能分析结果显示分别有4个DEmiRNAs(miR4228, miR8036, aly-miR390a-3p, zam-miR164d-5p)参与冷响应调控。3个(gma-miR1520o-3p, c53051_g1_i1_18088-5p, sly-miR10539-3p)参与非生物刺激响应调控。鉴定到的其它一些DEmiRNAs则参与了调节种子胚胎发育、萌发、休眠过程以及种皮发育中的黏液代谢等过程。KEGG通路分析，发现DEmiRs的靶基因还参与了“植物-病原体相互作用”等调控通路。(表3)

Function	Target	Annotation	miRNA	A1_vs._A0	A2_vs._A0	A2_vs._A1
Response to cold	c43520_g1_i1	Soluble inorganic pyrophosphatase 1, chloroplastic-like	miR4228	NC	NC	Up
	c48194_g1_i4	Phospholipase D p1-like	miR8036	Down	NC	Up
	c47711_g1_i2	Thylakoid lumenal 15 kDa protein 1, chloroplastic	aly-miR390a-3p	Up	NC	NC
	c47711_g1_i4	Hypothetical protein GLYMA_11G222100				
	c47711_g1_i3	Hypothetical protein VITISV_013914				
	c47711_g1_i1	Hypothetical protein GLYMA_11G222100				
Response to abiotic stimulus	c51250_g1_i1	Gibberellin receptor GID1B	zma-miR164d-5p	NC	NC	Down
	c29605_g1_i1	Uncharacterized protein LOC100247992	gma-miR1520o-3p	Up	NC	Down
	c34743_g1_i3	RNA pseudouridine synthase 1-like	c53051_g1_i1_18088-5p	NC	Down	Down
	c44975_g1_i2	Uncharacterized protein LOC105644596	sly-miR10539-3p	Up	NC	Down
Embryo development ending in seed dormancy	c46765_g2_i1	ruBisCO large subunit-binding protein subunit alpha	th-miR3434-5p	NC	Up	Up
	c52633_g2_i3	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH	MIR5998	NC	NC	Up
Seed germination Seed dormancy process	c51250_g1_i1	Gibberellin receptor GID1B	zma-miR164d-5p	NC	NC	Down
Mucilage extrusion from seed coat Mucilage metabolic process involved in seed coat development	c49078_g1_i1	Subtilisin-like protease SBT1.7	gma-miR1520o-3p	Up	NC	Down
Seed coat development	c50468_g1_i1	Subtilisin-like protease SBT1.7				

表3. 参与冷响应和种子发芽的关键miRNAs及其靶标

总结

本研究是桑寄生属植物miRNAs的首次研究，在冷胁迫下的桑寄生种子中鉴定出600个miRNAs以及103个差异表达的miRNAs，参与了“寒冷反应”，“非生物刺激反应”和“种子发育/萌发”的通路。为今后研究桑寄生属植物提供了有价值的资源。该研究结果能够提高人们对miRNA调控植物低温胁迫响应的理解，同时更好地进行桑寄生属植物的繁殖计划。

该研究基于华大智造的MGIEasy Small RNA建库技术和DNBSEQ测序平台实现了桑寄生种子中small RNA的测序鉴定。该应用案例表明华大智造的相关small RNA建库和测序技术可以实现miRNA的快速准确鉴定。

基因测序仪MGISEQ-2000

参考文献

1. Fu J, Wan L, Song L, et al. Identification of MicroRNAs in Taxillus chinensis (DC.) Danser Seeds under Cold Stress [J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 5585884.
2. Liu C-Y, Lin Y-C, Deng J-S, et al. Antioxidant, Anti-inflammatory, and Antiproliferative *Trends* ties of Taxillus sutchuenensis [J]. *American Journal of Chinese Medicine*, 2012, 40(2): 335-48.
3. Chinnusamy V, Zhu J, Zhu J-K. Cold stress regulation of gene expression in plants [J]. *Trends in Plant Science*, 2007, 12(10): 444-51.
4. Gu J, Hu W, Wu J, et al. miRNA Genes of an Invasive Vector Mosquito, Aedes albopictus [J]. *Plos One*, 2013, 8(7).
5. Yu Y, Jia T, Chen X. The "how' and "where' of plant microRNAs [J]. *New Phytologist*, 2017, 216(4): 1002-17.
6. Bologna N G, Schapire A L, Palatnik J F. Processing of plant microRNA precursors [J]. *Briefings in Functional Genomics*, 2013, 12(1): 37-45.
7. Wei S, Ma X, Pan L, et al. Transcriptome Analysis of Taxillusi chinensis (DC.) Danser Seeds in Response to Water Loss [J]. *Plos One*, 2017, 12(1).
8. Ji H, Chen M, Greening D W, et al. Deep Sequencing of RNA from Three Different Extracellular Vesicle (EV) Subtypes Released from the Human LIM1863 Colon Cancer Cell Line Uncovers Distinct Mirna-Enrichment Signatures [J]. *Plos One*, 2014, 9(10).
9. Chen M, Xu R, Rai A, et al. Distinct shed microvesicle and exosome microRNA signatures reveal diagnostic markers for colorectal cancer [J]. *Plos One*, 2019, 14(1).

推荐订购信息

产品类型	产品名称	产品货号
仪器	基因测序仪MGISEQ-2000RS	900-000035-00
	MGISP-100RS自动化样本制备系统	900-000070-00
	MGISP-960RS 自动化样本制备系统	900-000100-00
软件	MegaBOLT生信分析加速器(工作站式服务器)	970-000085-00
建库试剂	MGIEasy Small RNA文库制备试剂盒(24 RXN)	940-000196-00
测序试剂	MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装(FCL SE50)	1000012551

深圳华大智造科技股份有限公司

深圳市盐田区北山工业区综合楼11栋

4000-688-114

www.mgi-tech.com

MGI-service@mgi-tech.com

股票简称：华大智造

股票代码：688114

仅供研究使用

版权声明：本手册版权属于深圳华大智造科技股份有限公司所有,未经本公司书面许可,任何其他个人或组织不得以任何形式将本手册中的各项内容进行复制拷贝、编辑或翻译为其他语言。本手册中所有商标或标识均属于深圳华大智造科技股份有限公司及其提供者所有。

版本：2023年10月版

撰稿：陈麒慧　周琪

责任编辑：王其伟

审稿：江遥