

微 RNA Cre-miR914 参与调控衣藻 对高温胁迫的适应过程*

张风格^{1,3)} 王波^{1,3)} 王小林²⁾ 李小燕¹⁾ 李根保¹⁾ 李敦海¹⁾ 单革²⁾ 王高鸿^{1)**}

⁽¹⁾中国科学院水生生物研究所藻类生物学重点实验室, 武汉 430072; ⁽²⁾中国科学技术大学生命科学院, 合肥 230022;

⁽³⁾中国科学院大学, 北京 100049)

摘要 高温胁迫是生物所面临的常见环境胁迫, 因此在长期进化中生物逐渐进化出了对高温胁迫的高效适应能力. 目前, 有关藻类对高温胁迫的适应机制研究主要集中在生理调控及其相关的编码基因调控方面, 而有关非编码基因对高温适应的调控尚无报道. 在前期研究中, 我们通过对衣藻细胞的定量 PCR 筛选和生物信息学分析发现, 在多种胁迫处理后 *Cre-miR914* 表达下调且其靶基因有可能是 *RPL18*, 但对它们的作用却不清楚. 本研究中利用生物信息学结合降解组测序确定了 *Cre-miR914* 的靶基因是 *RPL18*, 接着利用定量 PCR 验证 *Cre-miR914* 及其靶基因的表达情况, 发现 *Cre-miR914* 表达在高温处理后明显下调, 而 *RPL18* 表达明显上调, 同时通过构建 *Cre-miR914* 过表达株和靶基因 *RPL18* 过表达株, 结合高温胁迫处理和抗性表型研究, 发现 *Cre-miR914* 过表达明显降低衣藻对抗高温胁迫能力, 而靶基因 *RPL18* 过表达提高了衣藻对抗高温胁迫能力. 本研究发现了一个 microRNA 参与调控藻类高温适应过程的分子机制, 即衣藻通过调控 *Cre-miR914* 及其靶基因 *RPL18* 表达参与了的高温胁迫适应过程.

关键词 高温, 微 RNA, 胁迫适应, 衣藻, 靶基因

学科分类号 180.1715

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0073

地球生物的生存环境多种多样, 除了正常的生活环境, 常常会遭遇胁迫环境的影响, 例如高温、低温、高盐、干旱、强光、营养缺乏和紫外线增强等. 生物在长期的进化过程中演化出各种适应胁迫的机制, 涉及 DNA 变化、RNA 转录、蛋白质合成和代谢适应等各个方面^[1]. 近年来的研究发现, 非编码 RNA, 尤其是微 RNA (microRNA, miRNA) 在生物胁迫适应中起到重要的调控作用. 在拟南芥中发现有 *miR396*、*miR319* 等 12 种 miRNA 参与干旱调控^[2-4]; 在 UV-B 辐射中发现 *miR156/157*、*miR169*、*miR170/171* 等 21 种 miRNA 参与适应过程^[5-9]; 在盐胁迫中, 发现有 *miR156*、*miR158* 等 14 种 miRNA 表达变化且参与适应调控^[7]. 在高等植物中, 有关胁迫下 miRNA 调控的工作主要是通过测序获得的, 但对其在胁迫适应中的功能研究开展的工作不多, 需要进一步加强. 随着地球变暖, 地球上各地高温频发, 而高温胁迫变成了一种影响地球生物的常见环境因素. 莱茵衣藻 (*Chlamydomonas*

reinhardtii) 是一种可以利用光能进行光合作用的单细胞鞭毛藻类, 它具有基因组较小 (100M, 已测序)、遗传转化操作便利、生长迅速、细胞以单倍体存在、突变表型易观察、保藏有大量现成的突变株等特点, 因此被认为是进行光合作用和细胞生物学的理想模式生物^[8-9]. 随着近期高通量测序和生物信息学的快速发展, 有研究表明, 在衣藻配子发育过程^[10-11]和硫缺乏胁迫中有 miRNAs 参与调控^[12]. 本实验室前期工作也表明在多种胁迫研究中有两组特殊的 miRNAs 参与胁迫适应调控, 但相关的研究主要基于高通量测序研究而缺乏 miRNAs 的后续功能研究^[13]. 我们在前期研究中发现 *Cre-miR914* 在多种胁迫 (高温、紫外和盐胁迫) 处理

* 国家载人航天工程 (SZ8-Exp11) 和国家自然科学基金 (30970688) 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 027-68780036, E-mail: space@ihb.ac.cn

收稿日期: 2017-03-04, 接受日期: 2017-05-09

下有下调的现象,同时发现它作用的靶基因有可能是 *RPL18*. 为了验证 *Cre-miR914* 和 *RPL18* 在衣藻高温适应的调控作用,我们通过生物信息学预测结合降解组测序确定了 *Cre-miR914* 的靶基因是 *RPL18*,接着利用定量 PCR 验证其表达情况、并结合过表达株构建和后续表型分析,对它们在衣藻高温适应调控中的作用机制进行研究.

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

实验用莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) cw15 株来自美国杜克大学衣藻遗传中心 (*Chlamydomonas Genetic Center*, Duke University, USA). 采用 TAP (Tris/Acetate/Phosphate) 培养基,在 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、光照强度 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、转速 130 r/min 摇床上培养^[4].

1.2 高温胁迫处理

取上述培养至对数期藻液 30 ml,置于 50 ml 灭菌培养管中.将培养皿置于不同强度高温胁迫 (42°C) 的水浴锅中处理 15、30、45、60、120 min,然后离心收集藻细胞,进行后续研究.

1.3 生物信息学预测与降解组测序

利用 RNAhybrid 对 *Cre-miR914* 进行靶基因预测,参数设置为(-b 1 -e 25 f 1, 8 -u 2)^[13].

为了进一步确认生物信息学预测结果,我们对高温(42°C)处理 30 min 后的衣藻细胞进行液氮固定,送给武汉言行生物技术公司进行降解组测序,获得经过 microRNA 降解的靶 mRNA 数据^[13].

1.4 定量 PCR

1.4.1 总 RNA 提取及 cDNA 合成. 总 RNA 提取采用 Invitrogen Trizol Reagent 试剂,提取方法参照试剂说明并作少许修改. cDNA 合成分为 mRNA 反转录 cDNA 合成和 miRNA 反转录 cDNA 合成. mRNA 反转录 cDNA 合成采用康为世纪公司 CW2582 试剂盒 $10 \mu\text{l}$ 体系. miRNA 反转录 cDNA 合成采用康为世纪公司 CW2141S 试剂盒 $10 \mu\text{l}$ 的反转录体系.

1.4.2 miRNA 荧光定量. 采用康为世纪公司 CW2142S 试剂盒推荐的 $20 \mu\text{l}$ 荧光定量反应体系. 加入 2 \times miRNA qPCR Mixture $10 \mu\text{l}$, $10 \mu\text{mol/L}$ Forward primer $0.4 \mu\text{l}$, $10 \mu\text{mol/L}$ Reverse primer $0.4 \mu\text{l}$, 模板 cDNA $1 \mu\text{l}$, ddH₂O $8.2 \mu\text{l}$. 反应条件依据引物退火温度而略有不同, PCR 程序为: 95°C 预变性 10 min, 95°C 变性 10 s, 58°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 反应共进行 40 个循环.

1.4.3 mRNA 荧光定量. 采用康为世纪公司 CW0957 试剂盒推荐的 $20 \mu\text{l}$ 荧光定量反应体系. 加入 2 \times UltraSYBR Mixture $10 \mu\text{l}$, $10 \mu\text{mol/L}$ Forward primer $0.4 \mu\text{l}$, $10 \mu\text{mol/L}$ Reverse primer $0.4 \mu\text{l}$, 模板 cDNA $1 \mu\text{l}$, ddH₂O $8.2 \mu\text{l}$. 反应条件依据引物退火温度而略有不同, PCR 程序为: 95°C 预变性 10 min, 95°C 变性 10 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 反应共进行 40 个循环. 相对定量 PCR 法计算表达情况计算公式为: $F=2^{-\Delta\Delta C_t}$. *Cre-miR914* 定量 PCR 采用的内参基因是 *U4*, 而 *RPL18* 定量 PCR 采用的内参基因是 *GAPDH*. 引物序列参见表 1.

Table 1 Primers used in this study

Genes		Primers sequences
<i>Cre-miR914</i>	Forward	CGCGCCGGAATCCGTGGAAA
	Reverse	Offered by miRNA q-PCR Assay Kit (CW2142s; Beijing ComWin Biotech Co.,Ltd)
<i>U4</i>	Forward	AGTGTCGCAGACTGTGAGG
	Reverse	GGAAGCGTTCCGAAGAA
<i>RPL18</i>	Forward	CAGCCATGGGTATCGACCTC
	Reverse	CTTCTTCCTGCCACAGCAGA
<i>GAPDH</i>	Forward	TGTGAACGAGGGCGACTA
	Reverse	TGCCGAACCTCTGCTCC

1.5 miRNA 过表达株构建

构建 miRNA 过表达质粒参照我们实验室前期开发的方法进行^[15]: 将启动子 pSAD 后的 GFP 片

段在 *Ned I* 和 *EcoR V* 2 个限制性内切酶处采用双酶切置换为萤光素酶(luciferase)基因,连接好以后在 luciferase 基因后采用 *EcoR I* 和 *EcoR V* 双酶切

分别连接上 *Cre-miR914* 的前体序列(以 *Cre-miR1157* 作为前体骨架改造而成)得到 miRNA 过表达质粒. 质粒再经过酶切线性化后进行玻璃珠转化, 利用巴龙霉素和荧光素酶筛选过表达株, 并经过定量 PCR 验证.

1.6 靶基因过表达株构建

构建靶基因过表达质粒也参照我们实验室前期开发的方法进行^[13]: 将启动子 pSAD 后的 GFP 片段在 *Ned I* 和 *EcoRV* 2 个限制性内切酶处采用双酶切置换为强启动子 HSP70-RBCS2, 连接好以后在该启动子后采用 *EcoR I* 和 *EcoRV* 双酶切分别连接上 *RPL18* 基因 CDS 序列从而得到 miRNA 少表达质粒. 质粒再经过酶切线性化后进行玻璃珠转化, 利用巴龙霉素筛选过表达株, 并经过定量 PCR 验证.

1.7 藻类生长测定

摇匀藻液, 取 2 ml 测定 A_{750} .

1.8 藻细胞活性测定(*Fv/Fm*)

取藻液 5 ml, 黑暗处理 10 min 后使用 Phyto-PAM 测量并记录样品 *Fv/Fm* 值.

1.9 ROS 含量的测定

取藻液 1 ml, 3 000 r/min 离心收集后使用 PBS 重悬冲洗 2 次, 最终使藻细胞重悬于 1 ml PBS 缓冲液中待用. ROS 含量的测定使用碧云天公司活性氧检测试剂盒(S0033), 向上述重悬液中加入用 PBS 缓冲液稀释的 DCFH-DA, 使终浓度为 1 mmol/L. 37℃ 细胞培养箱内孵育 20 min. 每隔 3~5 min 颠倒混匀一下, 使探针和细胞充分接触. 孵育完成后再次使用 PBS 缓冲液离心重悬冲洗细胞 2 次. 使用多功能酶标仪(Filter Max F5, Molecular Devices) 在 488 nm 激发波长, 测量 525 nm 发射波长下发射光强度^[16].

1.10 膜脂过氧化(MDA)测定

参照文献[16]的方法.

1.11 统计学分析

本研究均有 3 个以上技术重复, 并经过 3 次独立实验验证, 对所有遗传转化细胞株都有 3 个生物学重复, 保证实验的可靠性. 数据利用 SPSS 13.0 软件进行差异显著性分析($P < 0.05$).

2 结 果

2.1 生物信息学预测与降解组测序确定 *Cre-miR914* 的靶基因是 *RPL18*

通过 RNAhybrid 对 *Cre-miR914* 进行靶基因预

测, 一共得到 3 个靶基因(*XM_001701174.1*、*XM_001691387.1*、*XM_001690833.1*). 由于 *XM_001701174.1*、*XM_001691387.1* 这 2 个转录本目前还没有已经注释的基因名, 而 *XM_001690833.1* 转录本注释的基因名为 *RPL18*; 为了进一步确定 *Cre-miR914* 的靶基因, 我们对高温处理后的衣藻的降解组数据进行了分析(表 2), 发现 *Cre-miR914* 降解的靶基因确实是 *RPL18*, 且 *Cre-miR914* 和 *RPL18* 在热激处理后表现为相反方向的表达调控(表 2).

Table 2 Identifying the corresponding targets of miRNAs by Degradome sequencin

Genes	Fold change	P_value
<i>Cre-miR914</i>	0.51	0.04
<i>RPL18</i>	2.1	0.002

2.2 高温对衣藻 *Cre-miR914* 及其靶基因 *RPL18* 表达表现出相反的调控

在前期的研究中, 我们通过测序发现微 RNA *Cre-miR914* 的表达在多种胁迫处理下出现了下调, 同时经过生物信息学计算和降解组测序发现 *Cre-miR914* 的靶基因是 *RPL18*. 为了验证测序结果和靶基因预测结果, 对不同处理时间微 RNA 及其靶基因的表达情况进行了定量 PCR 验证, 结果如图 1 所示, 与对照比较, 高温处理下微 RNA *Cre-miR914* 的表达出现了显著降低, 只有对照的 50%~80%. 而靶基因的表达出现了显著的加大, 分别达到对照的 2 倍以上. 由于微 RNA 和对应靶基因的调控方向是相反的, 这也为 *Cre-miR914* 的靶基因是 *RPL18* 提供了实验依据.

2.3 微RNA 和靶基因过表达株构建及验证

利用巴龙霉素初筛结合荧光素酶阳性株再筛, 并经过定量 PCR 验证, 获得过表达藻株 3 株, 编号分别为 m914-1、m914-2、m914-3. 它们的 *Cre-miR914* 表达量相较于对照分别提高到 1.5 倍以上, 与此同时 *Cre-miR914* 的靶基因 *RPL18* 含量仅为对照 50%以下. 实验结果如图 2a.

另外, 利用巴龙霉素初筛并经过定量 PCR 验证, 获得的 *RPL18* 过表达株 3 株, 编号分别为 rpl18-1、rpl18-2、rpl18-3, 它们的 *RPL18* 基因表达量提高为对照的 10 倍以上, 而它们的 *Cre-miR914* 基因表达量分别降低为对照的 70%以下(图 2b).

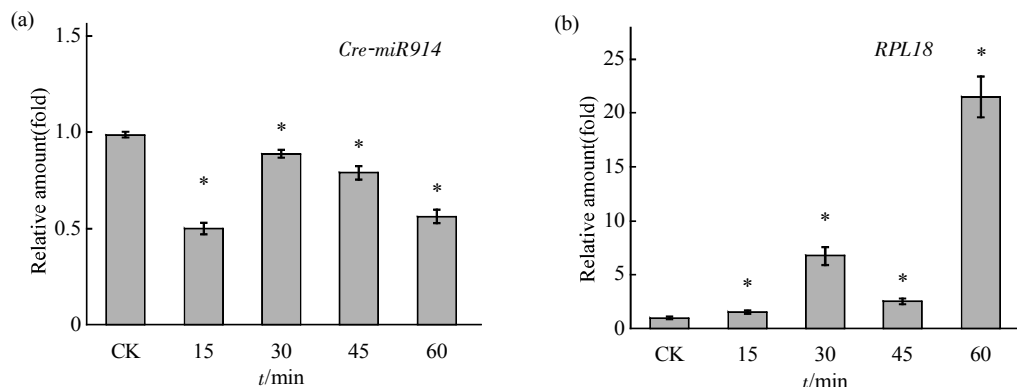


Fig. 1 The effect of heat shock on the expression of miRNA (a) and its target gene (b)

*Indicates that differences between the treated cells under heat shock and the control cells (CK, no treatment) were considered to be significant at $P < 0.05$.

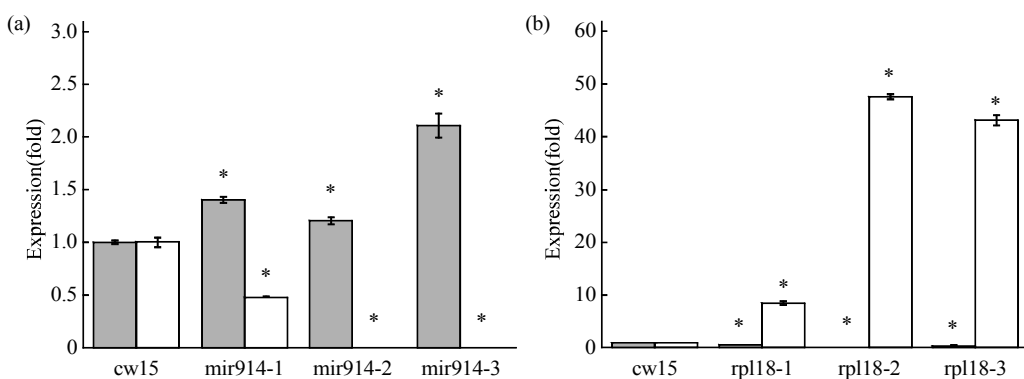


Fig. 2 The expression folds of Cre-miR914 and RPL18 in miRNA overexpression (a) and target gene overexpression (b) cell lines

cw15: The wild-type line; mir914-1, mir914-2 and mir914-3: Different strains of *Cre-miR914* overexpression; rpl18-1, rpl18-2 and rpl18-3: Different strains of *RPL18* overexpression. *Indicates that differences between the overexpressing lines and the wild-type lines were significant at $P < 0.05$. ■: *Cre-miR914*; □: *RPL18*.

2.4 过表达 Cre-miR914和靶基因 RPL18对胁迫下生长的影响

小 RNA 与靶基因在细胞内起着相反的作用。如图 3 所示, *Cre-miR914* 过表达突变株在高温胁迫条件下的生长都明显低于对照株 (图中 cw15-42°C), 而靶基因 *RPL18* 过表达突变株在高温胁迫条件下的生长都明显高于对照株 (图中 cw15-42°C)。这些结果显示 *Cre-miR914* 在胁迫下起着下调生长的作用, 但它的靶基因 *RPL18* 起着反向的调控作用。

2.5 过表达 Cre-miR914和靶基因 RPL18对胁迫下细胞活性的影响

在藻类等光合生物中, 光合作用的活性 (Fv/Fm) 可以反映出细胞的活性。如图 4, *Cre-miR914* 过表达株 (mir914-1、mir914-2 和 mir914-3) 在热激胁迫下细胞活性 (Fv/Fm) 值都呈现出不断减小的趋势, 并且其值都显著低于对照株 (cw15-42°C), 而 *RPL18* 过表达株在热激胁迫下细胞活性 (Fv/Fm) 值都显著高于对照株 (cw15-42°C)。

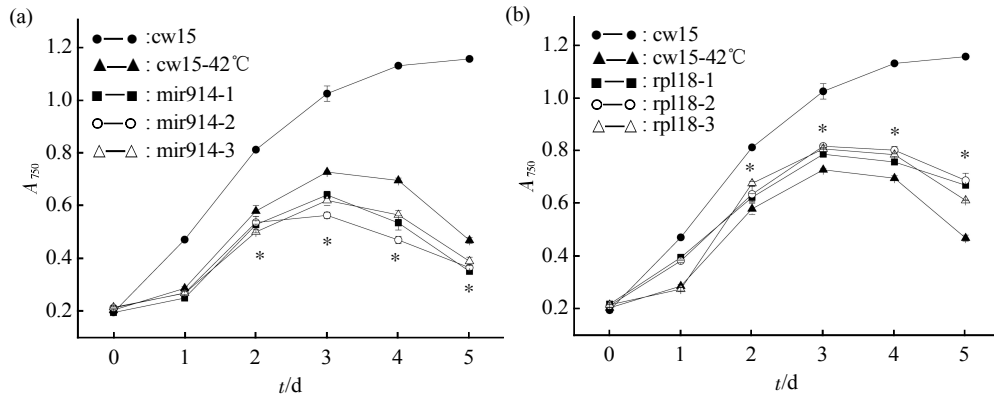


Fig. 3 The effect of miRNA overexpression (a) and target gene overexpression (b) on growth under heat shock

cw15: The wild-type line without treatment of heat shock; cw15-42°C: The wild-type line under heat shock; mir914-1, mir914-2 and mir914-3: Different strains of *Cre-miR914* overexpression under heat shock; rpl18-1, rpl18-2 and rpl18-3: Different strains of *RPL18* overexpression under heat shock. *Indicates that differences between the overexpression lines (all 3 biological repeats) and the wild-type lines (cw15-42°C) were considered to be significant at $P < 0.05$.

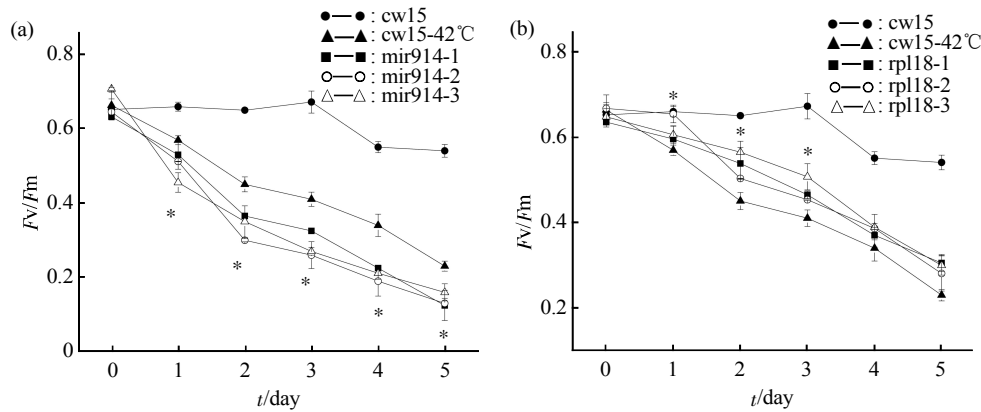


Fig. 4 The effect of miRNA overexpression (a) and target gene overexpression (b) on cell vitality (Fv/Fm) under heat shock

cw15: The wild-type line without treatment of heat shock; cw15-42°C: The wild-type line under heat shock; mir914-1, mir914-2 and mir914-3: Different strains of *Cre-miR914* overexpression under heat shock; rpl18-1, rpl18-2 and rpl18-3: Different strains of *RPL18* overexpression under heat shock. *Indicates that differences between the overexpression lines (all 3 biological repeats) and the wild-type lines (cw15-42°C) were considered to be significant at $P < 0.05$.

2.6 过表达 Cre-miR914和靶基因 RPL18对胁迫下细胞活性氧产生的影响

细胞在胁迫环境下会泄漏出活性氧, 通常损伤的程度越大, 细胞产生活性氧的产量越大. 如图 5, *Cre-miR914* 过表达株在热激胁迫下细胞活性氧(ROS)产生明显高于或等于对照株(cw15-42°C), 而 *RPL18* 过表达株在热激胁迫下细胞活性氧(ROS)产生明显低于对照株(cw15-42°C).

2.7 过表达Cre-miR914和靶基因 RPL18 对胁迫下细胞膜脂过氧化产生的影响

活性氧也攻击膜脂系统, 因此膜脂过氧化也反映出细胞的损伤程度. 如图 6, *Cre-miR914* 过表达株在热激胁迫下细胞膜脂过氧化(MDA)明显高于或等于对照株(cw15-42°C), 而 *RPL18* 过表达株在热激胁迫下细胞膜脂过氧化(MDA)产生明显低于对照株(cw15-42°C).

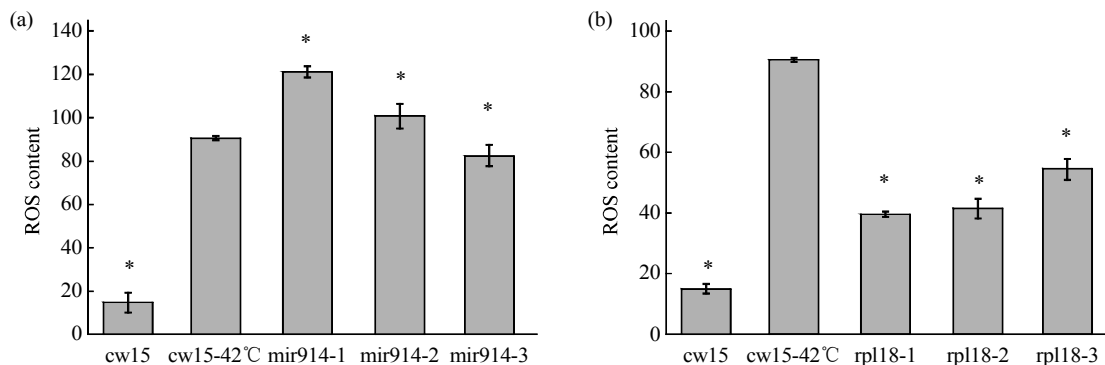


Fig. 5 The effect of miRNA overexpression (a) and target gene overexpression (b) on ROS production under heat shock

cw15: The wild-type line without treatment of heat shock; cw15-42°C: The wild-type line under heat shock; mir914-1, mir914-2 and mir914-3: Different strains of *Cre-miR914* overexpression under heat shock; rpl18-1, rpl18-2 and rpl18-3: Different strains of *RPL18* overexpression under heat shock. *Indicates that differences between the overexpression line and the wild-type lines (cw15-42°C) were considered to be significant at $P < 0.05$.

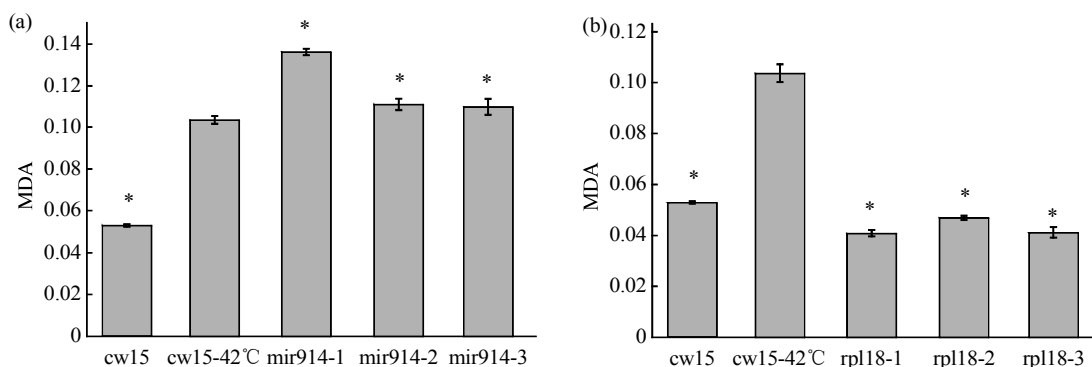


Fig. 6 The effect of miRNA overexpression (a) and target gene overexpression (b) on lipid peroxidation (MDA) under heat shock

cw15: The wild-type line without treatment of heat shock; cw15-42°C: The wild-type line under heat shock; mir914-1, mir914-2 and mir914-3: Different strains of *Cre-miR914* overexpression under heat shock; rpl18-1, rpl18-2 and rpl18-3: Different strains of *RPL18* overexpression under heat shock. *Indicates that differences between the overexpression line and the wild-type lines (cw15-42°C) were considered to be significant at $P < 0.05$.

3 讨 论

近年来研究发现，非编码 RNA 尤其是 miRNA，参与多种多样的植物胁迫反应调控过程，包括营养缺乏、干旱、冷害、热激、盐胁迫、紫外辐射、机械伤害及细菌感染等^[17]各种胁迫因子的适应。随着高通量测序技术的快速发展，极大地促进了胁迫环境诱导 miRNA 的研究。在拟南芥中发现有 *miR396*、*miR168*、*miR167*、*miR165*、*miR319* 等 12 种 microRNA 是干旱诱导调控的，其靶基因

包括 *GRF*、*AGO*、*ARF*、*TCP/MYB* 等多种蛋白质，涉及细胞代谢、生长和转录调控等多个方面^[3-4]；在 UV-B 辐射中发现有 21 种 microRNA 表达，包括 *miR156/157*、*miR159/319*、*miR160*、*miR165/166*、*miR167*、*miR169*、*miR170/171* 等，调控的靶基因包括 *SBP-LIKE*、*MYB*、*ARF*、*HD-ZIPIII*、*ARF*、*NFY/MiHAP2-1*、*SCL* 等^[5-6]；在盐胁迫中，发现有 *miR156*、*miR158*、*miR159/319*、*miR396* 等 13 种 microRNA 上调，而 *miR398* 下调，对应的靶基因包括 *SBP-LIKE*、*PPR*、*TCP/MYB*、*GRF*、

CSD 等^[7]; 在热激中, 小麦有 32 种 miRNA 表达差异, 包括 *miR156*、*miR159*、*miR160*、*miR166*、*miR168* 和 *miR169* 等上调, 而 *miR172* 下调, 对应的靶基因为 *SBP-LIKE*、*MYB*、*ARF*、*HD-ZIPIII*、*AGO*、*MiHAP2-1*、*AP2-LIKE* 等^[18]. 通过 miRNA 过表达和抑制表达等遗传操作, 可以对特定 miRNA 的功能进行研究, 结果显示: 在拟南芥中过表达 *miR156* 可以显著提高其抗胁迫的能力, 而 *miR156* 表达降低了植物对胁迫的敏感性^[19]; *miR169* 通过调控 NFY 转录因子调控一系列的胁迫反应基因, 提高了植物的抗胁迫能力, 同时促进了早期花发育^[20-21]; 过表达 *miR319* 可以提高水稻的抗冷害能力^[22]; 过表达 *miR395c* 和 *395e* 在胁迫下表现出完全不同的适应性^[23]; 过表达 *miR396c* 降低了水稻的抗盐碱能力等^[24], 但过表达 *miR396* 增加了紫外 B 对拟南芥抑制能力^[6]. 许多有关 miRNA 调控细胞发育、分化和胁迫适应的例子被发现^[2]. 在高等植物中, 有关胁迫下 miRNA 调控的工作主要是通过测序获得的, 但对其在胁迫适应中的功能研究开展的工作不多. 相对于高等植物的 miRNA 研究, 藻类的 miRNA 研究开展的工作并不多, 主要的工作也是通过高通量测序获得的, 发现在衣藻配子发育^[10-11]和缺硫培养中有 miRNA 参与^[12], 并没有对发现的 miRNA 进行功能研究, 因此需要进一步加强.

我们实验室在前期发现, 衣藻在高盐、高温、紫外三种胁迫环境出现了两类表达量情况变化完全不同的 miRNA 基因^[13]: 第 I 类 miRNA, 其表达量在三种胁迫处理条件下都出现了明显的上调; 第 II 类 miRNA, 其表达量在三种胁迫处理条件下都出现了明显的下调. 我们通过 miRNA 定量 PCR 技术检测 miRNA 表达量及 miRNA 功能研究发现: *Cre-miR906-3p* 的大量表达有利于细胞应对盐、高温和紫外线胁迫, 而其靶基因 *ATP4* 过表达时衣藻细胞对上述三种胁迫的适应能力降低; *Cre-miR910* 过表达降低了衣藻细胞应对盐、高温和紫外线胁迫的能力, 而其靶基因 *NCR2* 过表达时衣藻细胞对上述三种胁迫的适应能力增强. 另外我们还发现 *Cre-miR914* 与 *Cre-miR918* 有类似的调控规律, 但对其功能没有开展研究. 本研究正是基于以上的研究基础开展的.

本研究中我们利用生物信息学结合降解组测序确定了 *Cre-miR914* 的靶基因是 *RPL18*, 接着利用定量 PCR 验证, 发现 *Cre-miR914* 在高温表达明显

下调, 而 *RPL18* 出现明显表达上调, 同时通过构建 *Cre-miR914* 过表达、靶基因 *RPL18* 过表达株, 结合高温胁迫处理和抗性表型研究, 发现 *Cre-miR914* 过表达明显抑制衣藻对抗高温胁迫能力, 而靶基因 *RPL18* 过表达增强了衣藻对抗高温胁迫能力. *RPL18* 是核糖体蛋白, 在调控细胞的蛋白质合成、细胞生长和凋亡等方面起到重要作用^[25-27]. 另外发现过表达核糖体蛋白 *RPL44* 明显提高了灰绿曲霉(*Aspergillus glaucus*)的抗胁迫能力^[28]. 在本研究中, 我们发现衣藻有可能是通过调低 *Cre-miR914* 表达而加大 *RPL18* 的表达量, 继而调控细胞的蛋白质合成, 增强其抗胁迫的适应能力. 以上结果显示 *Cre-miR914* 及其靶基因 *RPL18* 参与了衣藻的高温胁迫适应调控, 本研究提出了一个 miRNA 参与调控藻类高温适应过程的分子机制.

miRNA 的靶基因研究报道较多, 各种研究技术和方法也很多, 但不可忽视的一点是 miRNA 基因往往是多靶基因的, 也即可供其调控的靶基因往往具有多个^[29-30]. 我们的研究虽然确定了 *Cre-miR914* 的一个调控靶基因是 *RPL18*. 但有关 *RPL18* 基因的功能及其在衣藻代谢过过程中的作用, 目前尚缺乏深入研究, 初步判断在调控细胞蛋白质合成方面具有重要的作用. 而这对后续的、更深入的机理研究是很有必要的, 因此未来在靶基因方面的研究也是一个值得深入的领域.

在本研究中我们选用的是细胞生长、光合活性、ROS 含量及膜脂过氧化率等指标来评价胁迫环境对衣藻细胞生长的影响. 虽然这些指标经常用于藻类和植物细胞生长情况的检测, 但其往往只能解释一些表观变化, 而无法深入到代谢或分子调控机理层面, 我们研究团队目前正计划从代谢组水平上进行探索, 期望下一步在此方面的研究能有所突破.

参 考 文 献

- [1] Chen L Z, Xie M, Wang G H, et al. The combined effects of UV-B radiation and herbicides on photosynthesis, antioxidant enzymes and DNA damage in two bloom-forming cyanobacteria. *Ecotoxicol Environ Safety*, 2012, **80**(1): 224-230
- [2] Khraiweh B, Zhu J K, Zhu J H. Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochim Biophys Acta*, 2012, **1819**(2): 137-148
- [3] Zhou L, Liu Y, Liu Z, et al. Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. *J Exp Bot*, 2010, **61**(15): 4157-4168
- [4] Zhao B, Liang R, Ge L, et al. Identification of drought-induced

- microRNAs in rice. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, **354**(2): 585–590
- [5] Zhou X, Wang G, Zhang W. UV-B responsive microRNA genes in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Syst Biol*, 2007, **3**: 103
- [6] Casadevall R, Rodriguez R E, Debernardi J M, *et al.* Repression of growth regulating factors by the microRNA396 inhibits cell proliferation by UV-B radiation in *Arabidopsis Leaves*. *Plant Cell*, 2013, **25**(9): 3570–3583
- [7] Liu H H, Tian X, Li Y J, *et al.* Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA*, 2008, **14**(5): 836–843
- [8] Pan J M. Cilia and ciliopathies: From *Chlamydomonas* and beyond. *Sci Chin Ser C-Life Sci*, 2008, **51**(6): 479–486
- [9] Merchant S S, Prochnik S E, Vallon O, *et al.* The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, 2007, **318**(5848): 245–251
- [10] Molnar A, Schwach F, Studholme D J, *et al.* miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature*, 2007, **447**(7148): 1126–U15
- [11] Zhao T, Li G L, Mi S J, *et al.* A complex system of small RNAs in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene Dev*, 2007, **21**(10): 1190–1203
- [12] Shu L F, Hu Z L. Characterization and differential expression of microRNAs elicited by sulfur deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *BMC Genomics*, 2012, **13**: 108
- [13] Gao X, Zhang F, Hu J, *et al.* MicroRNAs modulate adaption to multiple abiotic stresses in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Sci Rep*, 2016, **6**: 38228
- [14] Harris E H. The *Chlamydomonas* sourcebook. A comprehensive guide to biology and laboratory use. London: Academic Press, 2009
- [15] Hu J, Deng X, Shao N, *et al.* Rapid construction and screening of artificial microRNA systems in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J*, 2014, **79**(6): 1052–1064
- [16] He Y Y, Hader D P. UV-B-induced formation of reactive oxygen species and oxidative damage of the cyanobacterium *Anabaena* sp.: protective effects of ascorbic acid and N-acetyl-L-cysteine. *J Photochem Photobiol B-Biol*, 2002, **66**(2): 115–124
- [17] Sunkar R, Li Y F, Jagadeeswaran G. Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trend Plant Sci*, 2012, **17**(4): 196–203
- [18] Xin M, Wang Y, Yao Y, *et al.* Diverse set of microRNAs are responsive to powdery mildew infection and heat stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biol*, 2010, **10**: 123
- [19] Cui L G, Shan J X, Shi M, *et al.* The miR156-SPL9-DFR pathway coordinates the relationship between development and abiotic stress tolerance in plants. *Plant J*, 2014, **80**(6): 1108–1117
- [20] Xu M Y, Zhang L, Li W W, *et al.* Stress-induced early flowering is mediated by miR169 in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*, 2014, **65**(1): 89–101
- [21] Zhang X H, Zou Z, Gong P J, *et al.* Over-expression of microRNA169 confers enhanced drought tolerance to tomato. *Biotechnol Lett*, 2011, **33**(2): 403–409
- [22] Yang C H, Li D Y, Mao D H, *et al.* Overexpression of microRNA319 impacts leaf morphogenesis and leads to enhanced cold tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Environ*, 2013, **36**(12): 2207–2218
- [23] Kim J Y, Lee H J, Jung H J, *et al.* Overexpression of microRNA395c or 395e affects differently the seed germination of *Arabidopsis thaliana* under stress conditions. *Planta*, 2010, **232**(6): 1447–1454
- [24] Gao P, Bai X, Yang L, *et al.* Over-expression of osa-MIR396c decreases salt and alkali stress tolerance. *Planta*, 2010, **231**(5): 991–1001
- [25] Liang X, Liu Y, Xie L, *et al.* A Ribosomal protein AgRPS3aE from halophilic *Aspergillus glaucus* confers salt tolerance in heterologous organisms. *Int J Mol Sci*, 2015, **16**(2): 3058–3070
- [26] Xu T, Lee K, Gu L, *et al.* Functional characterization of a plastid-specific ribosomal protein PSRP2 in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions. *Plant Physiol Biochem*, 2013, **73**(1): 405–411
- [27] Zhang J, Yuan H, Yang Y, *et al.* Plastid ribosomal protein S5 is involved in photosynthesis, plant development, and cold stress tolerance in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 2016, **67**(9): 2731–2744
- [28] Liu X D, Xie L, Wei Y, *et al.* Abiotic stress resistance, a novel moonlighting function of ribosomal protein RPL44 in the halophilic fungus *Aspergillus glaucus*. *Appl Environ Microbiol*, 2014, **80**(14): 4294–4300
- [29] Voshall A, Kim E J, Ma X, *et al.* Identification of AGO3-associated miRNAs and computational prediction of their targets in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*, 2015, **200**(1): 105–U254
- [30] Cerutti H, Ibrahim F. Turnover of mature miRNAs and siRNAs in plants and algae. *Adv Exp Med Biol*, 2011, **700**(1): 124–133

Cre-miR914 Regulates Heat Shock Adaptation in *Chlamydomonas reinhardtii**

ZHANG Feng-Ge^{1,3}), WANG Bo^{1,3}), WANG Xiao-Lin²), LI Xiao-Yan¹),

LI Gen-Bao¹), LI Dun-Hai¹), SHAN Ge²), WANG Gao-Hong¹**

¹) Key Laboratory of Algal Biology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China;

²) School of Life Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230022, China;

³) University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Heat shock is a common stress for life, while algae develops high efficient adaptation ability to heat shock during longtime evolution. Up to date, the researches about the mechanism of heat shock adaptation in algae focus just on physiological regulation and related coding genes, while there are few reports about non-coding genes on it. In the previous study, we found that *Cre-miR914* were down-regulated significantly under multiple stresses (heat shock, UV-B and salinity) in *Chlamydomonas reinhardtii* through Q-PCR screening experiments, and bioinformatics analysis showed that the target gene of *Cre-miR914* may be *RPL18*. But the functions of *Cre-miR914* and its target gene in heat shock adaptation are unclear, this study addressed these issues through multiple experiments. In this study, we identified the target of *Cre-miR914* through bioinformatics and degradome sequencing, and validated expression of *Cre-miR914* and *RPL18* under heat shock through Q-PCR. Then we constructed cell lines of *Cre-miR914* overexpression and *RPL18* overexpression for further study. And finally we performed stress adaptation experiments under heat shock stress to check the function of microRNA and its target in stress adaptation, which includes cell growth assay, cell vitality counting, reactive oxygen species (ROS) production and lipid peroxidation (MDA) measurements. Bioinformatics and degradome sequencing indicated the target of *Cre-miR914* is *RPL18*; Q-PCR results showed that *Cre-miR914* expression reduced under heat shock, but *RPL18* expression increased, which confirmed our previous results of screening experiment. Then we got more than 3 cell lines with overexpressing of *Cre-miR914* and *RPL18*. Further growth experiment under heat shock indicated that *Cre-miR914* overexpression lines had a lower growth than the wild-type line (cw15), while *RPL18* overexpression lines had a higher growth than the wild-type line (cw15). Cells vitality (photosynthesis activity) experiment under stress also demonstrated that *Cre-miR914* overexpression lines had a lower vitality than the wild-type line (cw15), while *RPL18* overexpression lines had a higher vitality. The cell damage (ROS production and MDA content) experiments showed that there were more cell damages (ROS production and MDA content) in *Cre-miR914* overexpression lines than the wild-type line (cw15), while that of *RPL18* overexpression lines were lower than the wild-type line (cw15). These results illustrated that overexpression of *Cre-miR914* reduced heat shock resistance ability in algae, while overexpression of *RPL18* increased heat shock resistance ability. We maybe discovered a new regulation mechanism of heat shock adaptation in algae, in which *Cre-miR914* and its target gene *RPL18* are engaged in adaptation regulation to heat shock in *Chlamydomonas reinhardtii*.

Key words heat shock, microRNA, stress adaptation, *Chlamydomonas reinhardtii*, target gene

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0073

*This work was supported by grants from China Manned Spaceflight Project (SZ8-Exp11) and The National Natural Science Foundation of China (30970688).

**Corresponding author.

Tel: 86-27-68780036, E-mail: space@ihb.ac.cn

Received: March 4, 2017 Accepted: May 9, 2017