

# 敲除和过表达 miRNA446 对其 靶基因 APP1 的表达模式影响

王婉君, 李 锐, 廖雪洪, 白 洁

(四川大学生命科学学院, 成都 610064)

**摘要:** 在本课题组前期研究中,通过基因芯片数据发现了一系列在胁迫应答中表达量有变化的 microRNA. 其中以 miRNA446 的变化尤为显著. 为进一步探求 miRNA446 在胁迫应答中的变化与功能,本实验通过在水稻中分别敲除和过表达 miR446,检测干旱和冷胁迫下, miR446 及其靶基因 APP1 的表达模式. 结果表明,12h 内野生型株系 miR446 的表达量升高至未胁迫的 3 至 5 倍,过表达株系中则是先降至低于未受胁迫时的 50% 后逐步上升,而 APP1 基因由于受到高水平 miR446 的剪切作用而一直降低,12h 可降低至未受胁迫时的 50% 以下. 敲除株系中,miR446 的表达量被完全抑制,在整个胁迫过程中均保持接近于零的水平,而 APP1 在胁迫中也仅有微弱的先降后升趋势.

**关键词:** 转基因; miRNA446; 非生物胁迫

**中图分类号:** Q786      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0490-6756(2017)04-0881-07

## Overexpression and inhibition of miR446 to study the expression pattern of its target gene APP1

WANG Wan-Jun, LI Rue, LIAO Xue-Hong, BAI Jie

**Abstract:** MicroRNA is a kind of small non-coding RNA, involved in plant growth and development, stress response and other physiological processes. In our previous study, a series of microRNA had been found that changed expression in the stress response on the basis of gene microarray. Among them, miR446 is particularly significant. To further explore the change and function of miRNA446 in the stress response, the expression pattern of its target gene APP1 under drought and cold stress had been studied by overexpression and inhibition of miR446 in rice. The results showed that in the overexpression rice, the expression of miR446 increased after the first drop while in wild-type miR446 increased 3 to 5 times higher in 12h, and APP1 gene decreased more than 50% in 12h due to the splicing action of high levels miR446. In the knockout rice, the expression of miR446 was completely inhibited in the whole process, remained close to zero, and APP1 increased after the first drop in a weak trend.

**Keywords:** transgenesis; miRNA446; abiotic stress

## 1 引言

MicroRNA 广泛存在于真核生物中<sup>[1,2]</sup>,是一类长度为 18~25 nt 的内源非编码单链小分子 RNA,在功能和结构上都具有保守性,可在转录后水平抑制靶基因的表达<sup>[3]</sup>. miRNA 具有 3 个明显特征:没有开放阅读框架,不能编码蛋白质;通常长度为 20~25 nt,但在 3'端可以有 1~2 个碱基的长度变化;成熟的 miRNA 5'端有一磷酸基团,3'端为羟基,这一特点使它与大多数寡核苷酸和功能 RNAs 的降解片段区别开来<sup>[4]</sup>.

在植物和动物体内, MicroRNA 是普遍存在的转录后基因调控因子<sup>[5]</sup>. 动物体内, miRNAs 调控着大约有 60% 的蛋白质编码基因,而植物体内的 miRNAs 只调控不到 1% 的蛋白编码基因<sup>[6]</sup>. 植物中 miRNAs 数量很少,但大部分 miRNAs 的靶 mRNA 是转录因子<sup>[6]</sup>,调控着花,叶,茎,根等的发育过程<sup>[7]</sup>,这些转录因子可以潜在参与从种子萌发到个体成熟的大部分发育过程. 所以一般认为 miRNAs 是发育过程的重要调控因子.

水稻(*Oryza sativa* L.)是草本稻属的一种,世界上最重要的农作物之一,由于其基因组较小,并且与其他单子叶植物具有较高的同源性,被看做是单子叶植物实验研究的模式植物<sup>[8]</sup>. 已有研究发现,水稻中多种 miRNAs 与干旱、盐和温度胁迫都有一定的相关性<sup>[9]</sup>. 比如,在干旱胁迫中,水稻 miR393 上调表达<sup>[10]</sup>,其靶基因—两个同源生长素受体基因(*OsTIR1* 和 *OsAFB2*)则显著下调表达<sup>[11-13]</sup>;另外,水稻圆锥花序中的 miR1425 在冷胁迫中下调表达,而其特异靶基因 *Rf-1*(编码编码 PPR 蛋白,可增加杂交水稻孕穗期对冷胁迫的耐受)在冷胁迫中上调表达<sup>[14]</sup>.

在本课题组前期研究中,艾涛波发现 miR446 对 SA、ABA、冷、热、PEG、盐胁迫等非生物胁迫均有应答<sup>[15]</sup>. 并通过 RACE 实验验证了 miR446 的 4 个预测靶基因,其中 *APP1* (LOC\_Os03g56930.1) 的剪切位点发生在与 miR446 碱基配对区域的第 10-11 位碱基之间. 这一剪切位点发生在 *APP1* 基因的内含子区域(第 1036-1037 个碱基),据此确定 miR446 通过剪切 *APP1* 的转录中间产物,抑制 *APP1* 的初级转录产物加工为成熟 mRNA. 对 *APP1* 在非生物胁迫中的表达模式分析得出, *APP1* 是受 miR446 调节的. 鉴于此,本研究通过在水稻中分别敲除和过表达 miR446,研究其在胁

迫条件下的表达量变化及其与靶基因 *APP1* 的相互作用,以期进一步探明 miR446 的功能及其调控网络.

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料

水稻-桂朝 2 号(*Oryza sativa* L. cv. Guichao No. 2)为本实验保存.

大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH5 $\alpha$ 、表达菌株 BL21(DE3)均为本实验室保存. 原核表达载体 pET-32a(+)和瞬时表达载体 pBI221 购自 Novagen 公司(Novagen, Germany). 测序和亚克隆载体 pMD19-T 购自大连宝生物工程有限公司(TaKaRa, Dalian, China).

质粒提取试剂盒 Plasmid Mini Kit I 购自 O-MEGA 公司, T4 DNA 连接酶、DNA 聚合酶、以及限制性内切酶购于 TAKARA. DNA 胶回收试剂盒购于天根公司. Trizol 试剂、反转录试剂盒、SYBR  $\odot$ R primeScript<sup>TM</sup> RT-PCR kit 购于 TaKaRa (Code: DRR063A),化学试剂购于 Sigma 公司. PCR 仪、荧光定量 PCR 仪为美国伯乐公司. 仪器分析采用 CFX Connect Real-Time System.

### 2.2 实验方法

2.2.1 水稻 miR446 过表达载体构建 根据 miR446 前体序列,设计引物 pre-miR446-F 和 pre-miR446-R. 利用 Trizol (Invitrogen) 抽提水稻幼苗总 RNA,反转录获得 cDNA. 以 cDNA 为模板, pre-miR446-F 和 pre-miR446-R 为引物,经 PCR 获得 miR446 基因. PCR 产物纯化回收后,连接 pEAZY-T 载体,转化大肠杆菌感受态,并挑取单菌落,测序对比.

获得重组质粒 pBWA(V)HS 载体和 pEAZY-T-miR446,同时用 *Xba* I 和 *Hind* III 两种限制性内切酶双酶切,回收纯化酶切产物. 用 T4 连接酶将酶切片段 16 $^{\circ}$ C 连接过夜. 连接产物转化大肠杆菌,挑取单菌落测序对比.

2.2.2 水稻 miR446 敲除载体构建 miR446 敲除载体中构建的序列是根据 Jun Yan<sup>[16]</sup> 等创新的基于短串联靶向模拟(STTM)技术,通过该技术设计了靶向 miR446 的序列,以降解 miR446. 序列设计工作由武汉伯远生物公司完成. 根据设计序列由北京六合基因公司人工合成核苷酸序列. miR446 敲除载体构建的过程与过表达载体相同.

2.2.3 转基因植株的获得 采用冻融法在农杆菌

感受态中转入经鉴定过的重组质粒, 挑选单克隆, 进行菌落 PCR 验证后用于植物转化. 利用农杆菌介导的遗传转化法<sup>[17]</sup> 参照文献步骤, 以水稻品种桂朝 2 号为转化受体材料, 进行愈伤组织的诱导、继代、分化、生根及遗传转化过程获得转基因植株.

### 2.2.4 APP1 基因实时荧光定量 PCR

(1) 以 5.8s 基因作为内参基因, 设计如下引物:

表 1 实验所用引物

Tab. 1 Primers used in this study

Primer	Primer sequence (5'-3')
APP1-qPCR-F	GCGTTTGCTGGCTTTGAT
APP1-qPCR-R	ACGCATTTGTCGCCACTC
5.8S F	GCAACGGATATCTCGGCTCTCGC
5.8S R	GGATGGCTCGGGCGCAACT

(2) RT 反应: 按 PrimeScript<sup>®</sup> RT reagent Kit (DRR037S) 说明进行反转录, 获得 cDNA, 置于 -20 °C 保存 (反应体系 10  $\mu$ L, 37 °C, 15 min, 85 °C, 5 sec).

(3) Real-time PCR 验证: 所用试剂盒为 Bio-Rad 公司的 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II, 按说明进行操作. 从 55~95 °C 进行溶解曲线分析, 去除引物二聚体和其他非特异性扩增. 每个样品均重复三次以避免加样误差, 实验数据利用 iQ5-Cycler 进行分析. 分析方法为  $\Delta\Delta C_t$  法.

## 3 结果与分析

### 3.1 miR446 过表达载体的构建

用引物 pre-miR446-F 和 pre-miR446-R 扩增水稻总 cDNA, PCR 扩增后获得 150bp 左右大小的片段 (图 1), 产物纯化后连接 pEAZY-T 载体, 测序序列为 175bp, 序列与本实验室前期获得的序列对比完全匹配, 即为 miR446 前体. 序列如下:

AAATATGTACTTCCTTTGTTTCACAG  
TGTAAGTCATTATAAAATTTCCACATTT  
ATATTGATGTTAATGAATCTATATAGATA  
TATATGTCTAGATTTATTAACATCAATAT  
GAATATGGGAAATGGTAGAATAACTTAC  
ATTGTGAAACGGAGGGAGTATATAGAAC  
TTGAAC

将 pBWA(V)HS 载体和 pEAZY-T-miR446 重组质粒同时用 *Xba* I 和 *Hind* III 两种限制性内切酶双酶切, 连接后获得重组质粒 pBWA(V)HS-premiR446.

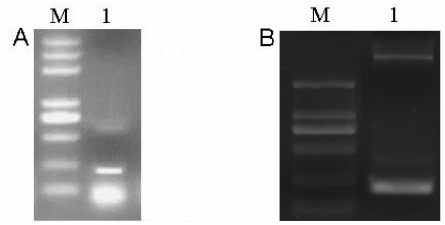


图 1 pBWA(V)HS-premiR446 过表达载体的构建  
A. pre-miR446 的 PCR 扩增, M: marker DL5000, 1: pre-miR446 PCR 条带; B. 菌液 PCR, M: marker DL5000, 1~3: 阳性菌落; C: 重组质粒的双酶切, M: marker DL2000, 1: 双酶切条带  
Fig. 1 Construction of overexpression vector pBWA(V)HS-premiR446

### 3.2 miR446 敲除载体的构建

根据 miR446 的序列, 武汉伯远生物公司设计出靶向 miR446 的短串联模拟靶序列: ccatttccatgctattcatattgatggttgttgttattgttctaatttaaatatggct taa-gaagaagaatccatttccatgctattcatattgatgccatttccatgctattcattttgatggttgttgttattgttctaatttaaatatggcttaaagaag aagaatccatttccatgctattcatattgatg

将合成序列的 STTM 序列与 pEAZY-T 载体连接, 可获得 pEAZY-STTM 重组质粒. 将 pBWA(V)HS 载体和 pEAZY-STTM 重组质粒同时用 *Xba* I 和 *Hind* III 两种限制性内切酶双酶切, 连接后获得重组质粒 pBWA(V)HS-STTM (图 2).

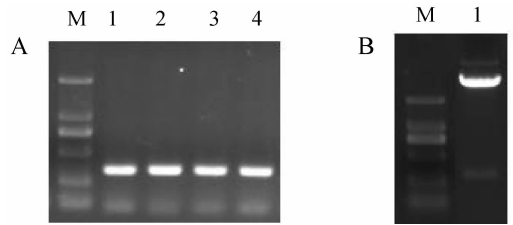


图 2 pBWA(V)HS-STTM 重组质粒的菌液 PCR 和双酶切  
A: pBWA(V)HS-STTM 重组质粒的菌液 PCR; B: 重组质粒双酶切  
Fig. 2 Restriction enzyme digestion and PCR amplification of pBWA(V)HS-STTM

### 3.3 miR446 过表达和敲除转基因水稻的获得

水稻成熟种子诱导产生愈伤组织后, 经与 pBWA(V)HS-miR446 和 pBWA(V)HS-STTM 的重组农杆菌共培养获得转基因植株 (图 3).

### 3.4 转基因水稻的鉴定

对 STTM 干扰的敲除植株采用 PCR 方式鉴定 (图 4).

miR446 是水稻自身的 miRNA, 因此 miR446 过表达植株不能直接采用总 DNA 进行 PCR 的方

式鉴定是否转基因成功,所以我们对两种转基因水稻均采用了 RT-PCR 的方式检测 miR446 表达量,

对比鉴定转基因水稻。

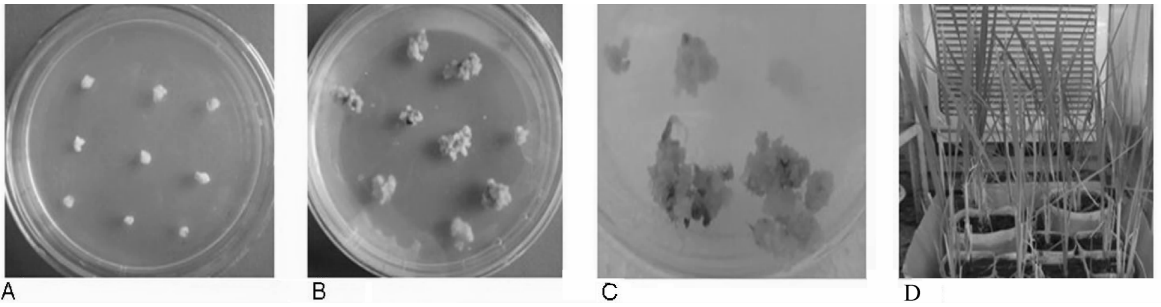


图 3 转基因水稻的转化生长过程图

Fig. 3 Growth process of transgenosis rice

A: 愈伤组织; B: 含有重组质粒的水稻愈伤组织能在含有羧苄青霉素培养基上诱导出更多愈伤组织; C: 愈伤组织生芽; D: 再经过两周得到无菌抗性转基因植株。

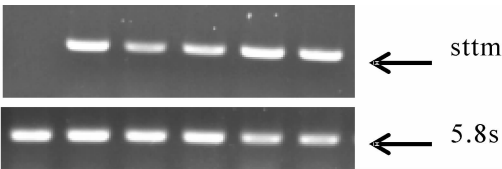


图 4 STTM 干扰转基因水稻 PCR 检测

Fig. 4 Detection of STTM transgenosis rice by PCR

分别以野生型、过表达和敲除三种水稻叶片 cDNA 为模板,以 miR446 的特异引物进行 RT-PCR 反应,并以水稻 5.8s 基因为内参基因,分析 miR446 在三种水稻中的表达量差异。由图 5 可看出,miR446 过表达植株中,L4、L5 和 L6 株系的 miR446 表达量明显较野生型植株高,L4 株系的 miR446 表达量是野生型的 6 倍,其余株系表达量上升倍数均有不同。同时,用 STTM 技术进行 miR446 敲除的 L4s、L5s 和 L6s 株系中 miR446 表达量均远远低于野生型水稻,甚至没有表达量。结果证明 miR446 过表达植株和 STTM 敲除植株均转基因成功,转基因率 100%。

### 3.5 水稻干旱和冷胁迫的基因表达分析

**3.5.1 野生型水稻胁迫下 miR446 及 APP1 基因表达分析** 前期研究显示,3 周野生型水稻幼苗在受到干旱和冷胁迫时,miR446 及其靶基因 APP1 均对两种胁迫有应答反应且表达模式相应进行改变。本实验用 RT-PCR 的方式,对野生型水稻在干旱和冷胁迫条件下,验证 24 h 内 miR446 及其靶基因 APP1 的表达量,实验结果与前期研究一致(如图 6)。野生型水稻幼苗在受到 25%PEG 胁迫 24 h 内,miR446 表达量升高,在 12 h 时甚至达到未胁迫的 5 倍,同时 APP1 的表达量是先降低后升高的。同样的,在 4 °C 冷胁迫 24 h 内,miR446 表达量

升高,在 12 h 时达到未胁迫的 3 倍,APP1 表达量的降低程度也要弱于 PEG 胁迫。

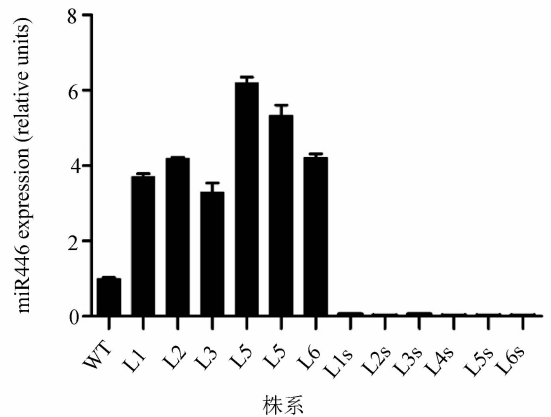


图 5 转基因水稻 miR446 表达量的 RT-PCR 鉴定 WT 为野生型水稻,L2-L6 为 miR446 过表达株系,L1s-L6s 为 STTM 转基因株系。

Fig. 5 Expression of miR446 in transgenosis rice

**3.5.2 miR446 过表达水稻胁迫下的 miR446 及 APP1 基因表达分析** 经过 RT-PCR 鉴定,已确定过表达株系中 miR446 的表达量明显提高。随机选择野生型和过表达株系幼苗各 6 株,用 25%PEG 和 4 °C 分别处理,在胁迫处理 0、3、6、12 和 24 h 取叶,液氮速冻后 -80 °C 保存备用。实验重复 3 次。

提取总 RNA,立刻反转录,并进行 RT-PCR,以 5.8s 为内参基因。RT-PCR 结果(图 7)显示 miR446 过表达株系在 25%PEG6000 和 4 °C 胁迫时,miR446 的表达量改变趋势并不像野生型一样增加,反而在受到胁迫后先降后升。同时,miR446 过表达株系中 APP1 的表达量在未受到胁迫时与野生型无明显差异,而在两种胁迫下均表现出与野生型不一样的趋势。野生型水稻受胁迫后,APP1

表达量先降后升, 而 miR446 过表达株系受胁迫后 APP1 的表达量一直降低, 在胁迫 24 h 时仍没有

回升的趋势. 这样的趋势推测应该是 miR446 对 APP1 剪切的结果.

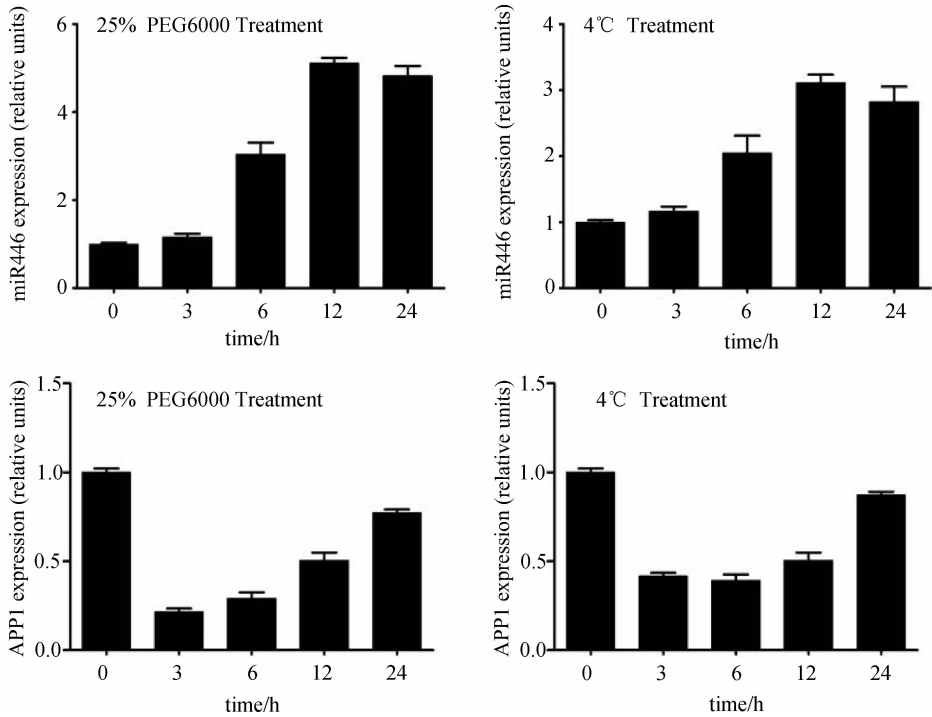


图 6 野生型水稻干旱和冷胁迫 24h 内 miR446 和 APP1 的表达模式

Fig. 6 Expression of miR446 and APP1 under stresses in wild rice

3.5.3 STTM 转基因水稻胁迫下的 miR446 及 APP1 基因表达分析 经过 RT-PCR 鉴定, 已确定 L1s-L6s 株系中 miR446 的表达量已接近于零, 证明 STTM 序列已成功转入水稻并达到完全抑制 miR446 的效果. 用 25% PEG 处理 L1s、L2s 和 L3s 株系, 用 4°C 处理 L4s、L5s 和 L6s 株系, 在胁迫处理 0、3、6、12 和 24 h 取野生型和过表达株系叶子, 液氮速冻后 -80 °C 保存备用. 分别提取水稻处理过的水稻叶子幼苗的总 RNA, 立刻反转录, 并进行 RT-PCR, 以 5.8s 为内参基因. RT-PCR 结果(图 8)显示 STTM 转基因株系在 25% PEG6000 和 4 °C 胁迫时, miR446 的表达量抑制保持在接近于零的水平, 在胁迫 24 h 内并没有表达量的改变, 说明 STTM 序列在转基因水稻中发挥了作用. 同时 STTM 转基因株系中 APP1 的表达量在未受到胁迫时是野生型水稻表达量的 2 倍. 这说明在没有 miR446 的情况下, APP1 的 mRNA 水平高于野生型水稻, APP1 确实是被 miR446 剪切调控的. 而在两种胁迫下 APP1 的表达量也表现出微弱的先下降后上升的趋势.

## 4 讨论

本实验采用的人工靶序列模拟 (artificial target mimicry, MIMIC) 是一种根据核酸序列人工设计相对应互补寡核苷酸的技术方法. 最初由 Franco-Zorrilla 等将靶向序列机制用于 miRNA 活性调节研究<sup>[18]</sup>. 经过长期的研究, Jun Yan<sup>[16]</sup> 等创新了一项基于短串联靶向模拟 (STTM) 技术, 该技术能触发对靶向小分子 RNA 的有效降解.

本实验通过设计 miR446 的 STTM 序列, 构建重组载体得到了 STTM 转基因水稻. 转基因水稻总 RNA 的 RT-PCR 结果表明, STTM 序列转录产物可完全抑制 miR446 的表达. 且在 STTM 转基因水稻受到干旱和冷胁迫时, miR446 的表达量一直都保持接近于零的低水平, 同时从 APP1 的表达量水平也可能看出, miR446 已被完全抑制. 但是, 即使 miR446 的表达量被完全抑制了, 在胁迫过程中, APP1 的表达量仍表现出微弱的下降趋势, 这说明可能存在其他调控网络能影响 APP1 基因的表达, 但由数量关系来看, miR446 仍是 APP1 的主要调控因子.

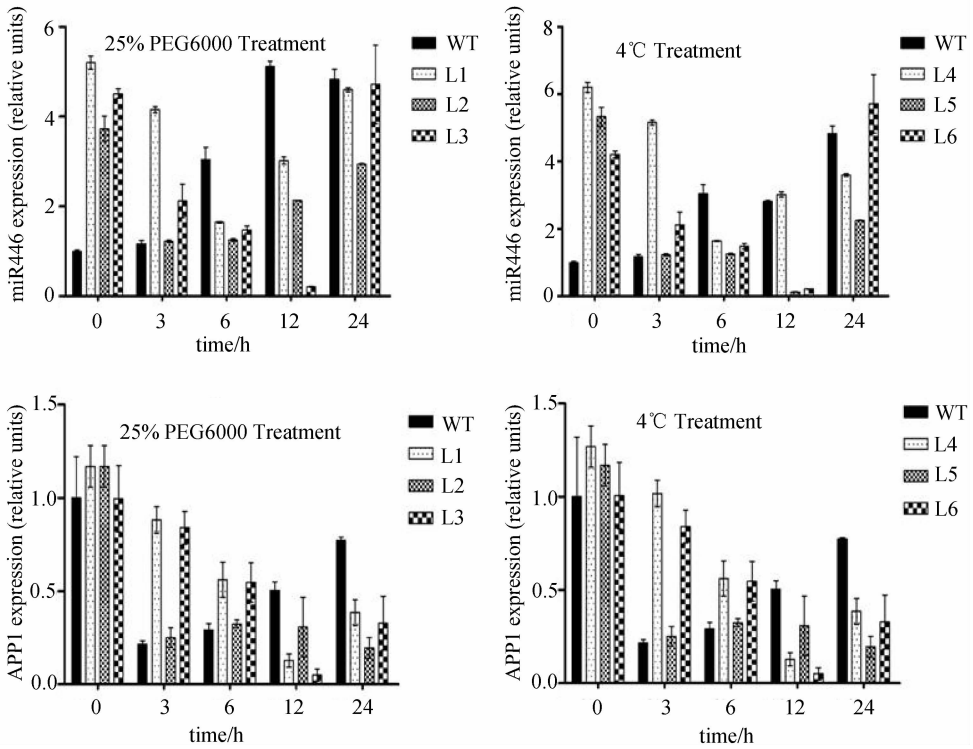


图 7 miR446 过表达水稻在胁迫中 miR446 及靶基因 APP1 表达量分析

Fig. 7 Expression of miR446 and APP1 under stresses in miR446 overexpression rice

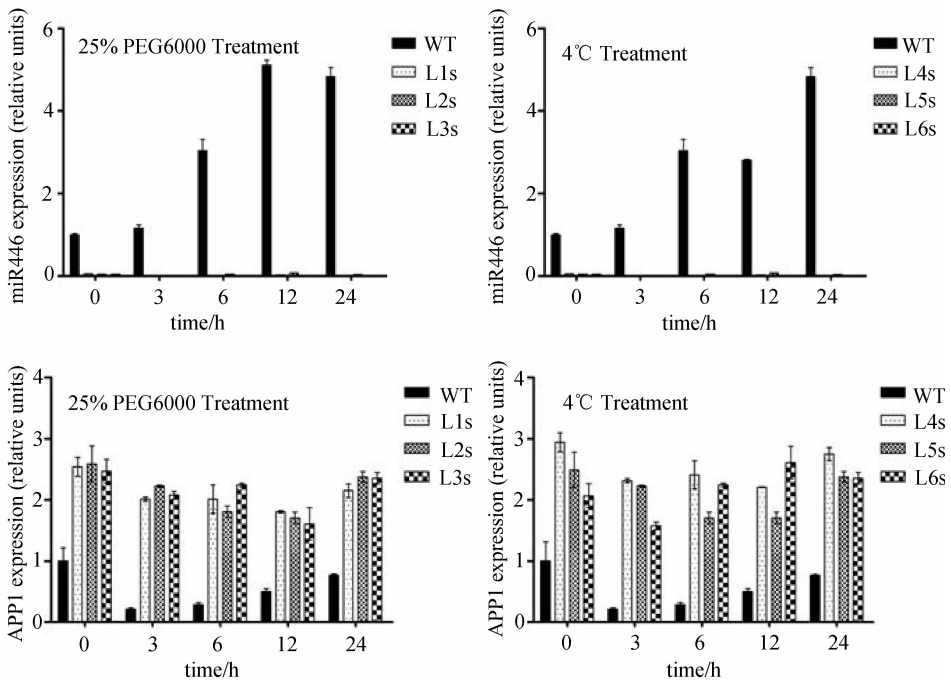


图 8 miR446 抑制水稻在胁迫中 miR446 及靶基因 APP1 表达量分析

Fig. 8 Expression of miR446 and APP1 under stresses in transgenesis rice

STTM 转基因株系中 APP1 的表达量在未受到胁迫时是野生型水稻表达量的 2 倍。说明在没有 miR446 的情况下, APP1 的 mRNA 水平高于野生型

水稻, APP1 确实是被 miR446 剪切调控的。而在两种胁迫下 APP1 的表达量也表现出微弱的先下降后上升的趋势。说明在非生物胁迫中, 水稻对 APP1 的

调控机制很有可能不止 miR446 一条途径。

我们已经证明 miR446 的靶基因 LOC\_Os03g56930.1 基因(即 APP1 基因)能通过 RACE 实验证明可被 miR446 剪切,剪切位点位于 APP1 基因的内含子区域。Meng *et al.*<sup>[19]</sup>报道 miR446 的另外 3 个靶基因: LOC\_OS06g24594.2、LOC\_OS06g24594.5 和 LOC\_OS06g24594.6,也都在第二个内含子区域被 miR446 剪切。这种对靶基因的内含子区域进行剪切调控的方式是一种新的调控机制,对这种机制并没有清晰的认识,但是,对于 miR446 及靶基因 APP1,从干旱和冷胁迫的对应表达量来看,miR446 对靶基因 APP1 是有调控关系的。

水稻作为重要的粮食作物与模式生物,有越来越多的证据证明 miRNA 对水稻的生长发育起着重要作用。但由于 miRNA 的系统研究起步较晚,仍大多停留在预测水平上,需要更进一步的大量实验数据支持。随着生命科学、生物信息技术及转基因技术的不断发展,对水稻 miRNA 及其靶基因的研究势必更加深入与丰富,为水稻的种质资源创新开辟新的领域。

#### 参考文献:

- [1] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116: 281.
- [2] Pfeffer S, Zavolan M, Grässer F A, *et al.* Identification of virus-encoded microRNAs [J]. *Science*, 2004, 304: 734.
- [3] Voinnet O. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs [J]. *Cell*, 2009, 136:669.
- [4] Ruvkun G. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world [J]. *Science*, 2001, 294:797.
- [5] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, *et al.* Identification of novel genes coding for small expressed RNAs [J]. *Science*, 2001, 294: 853.
- [6] Lewis B P, Burge C B, Bartel D P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets [J]. *Cell*, 2005, 120: 15.
- [7] Reinhart B J, Slack F J, Basson M, *et al.* The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 2000, 403: 901.
- [8] Holtorf H, Guitton M C, Reski R. Plant functional genomics [J]. *Sci Nature*, 2002, 89: 235.
- [9] Jeong D H, Park S, Zhai J, *et al.* Massive analysis of rice small RNAs: mechanistic implications of regulated microRNAs and variants for differential target RNA cleavage [J]. *Plant Cell*, 2011, 23: 4185.
- [10] Zhao B, Liang R, Ge L, *et al.* Identification of drought-induced microRNAs in rice [J]. *Biochem Biophys Res Communi*, 2007, 354: 585.
- [11] Wu L, Zhang Q, Zhou H, *et al.* Rice MicroRNA effector complexes and targets [J]. *Plant Cell*, 2009, 21: 3421.
- [12] Zhou M, Lianfeng G U, Pingchuan L I, *et al.* Degradome sequencing reveals endogenous small RNA targets in rice (*Oryza sativa* L. ssp. indica) [J]. *Frontiers in Biology*, 2010, 5: 67.
- [13] Xia K, Wang R, Ou X, *et al.* OsTIR1 and OsAFB2 Downregulation via OsmiR393 Overexpression Leads to More Tillers, Early Flowering and Less Tolerance to Salt and Drought in Rice [J]. *PloS One*, 2012, 7: e30039.
- [14] Komori T, Imaseki H. Transgenic rice hybrids that carry the Rf-1, gene at multiple loci show improved fertility at low temperature [J]. *Plant Cell & Environ*, 2005, 28: 425.
- [15] 廖雪洪, 艾涛波, 李锐, 等. 水稻 miR446 及其靶基因 APP1 在非生物胁迫中的功能研究 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2016, 53: 1155.
- [16] Tang G, Yan J, Gu Y, *et al.* Construction of short tandem target mimic (STTM) to block the functions of plant and animal microRNAs [J]. *Methods*, 2012, 58: 118.
- [17] Hiei Y, Ohta S, Komari T, *et al.* Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA [J]. *Plant J*, 1994, 6: 271.
- [18] Franco-Zorrilla J M, Valli A, Todesco M, *et al.* Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity [J]. *Nat Genet*, 2007, 39:1033.
- [19] Meng Y, Shao C, Ma X, *et al.* Introns targeted by plant microRNAs: a possible novel mechanism of gene regulation [J]. *Rice(NY)*, 2013, 6: 8.