

李 倩,郭九峰,高海荣. 高压静电场胁迫对甘草生长过程中 RNA 的影响[J]. 江苏农业科学,2020,48(13):76-80.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.13.015

高压静电场胁迫对甘草生长过程中 RNA 的影响

李 倩¹,郭九峰¹,高海荣²

(1. 内蒙古大学物理科学与技术学院/离子束生物工程重点实验室,内蒙古呼和浩特 010020;

2. 内蒙古大学生命科学学院,内蒙古呼和浩特 010020)

摘要:为探究高压静电场对甘草生长过程中 RNA 含量的影响,本试验以甘草幼叶、嫩茎和种子为研究材料,依次采用十二烷基苯磺酸钠(SDS)法、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法、异硫氰酸胍(Trizol)法提取甘草幼叶、嫩茎、种子的 RNA,并进行比较分析。并通过紫外分光光度法,分析检测经不同强度高压静电场(0、12、15、18 kV)处理之后生长过程中甘草不同组织 RNA 含量。结果表明,3 种方法均能从甘草中提取出 RNA。SDS 法是适用于甘草组织 RNA 提取的最佳方法。经不同强度高压静电场处理,甘草 RNA 含量增加,降解含量降低。高压静电场影响最明显的是处理电场强度为 18 kV 时,甘草生长 9 d 时, RNA 含量最高。本研究初步探究了高压静电场对甘草生长过程中 RNA 含量的影响,为甘草 RNA 的研究和高压静电场与分子生物学的研究提供了基础参考。

关键词:甘草;高压静电场;RNA 提取;SDS 法;RNA 含量

中图分类号:S567.7⁺10.1

文献标志码:A

文章编号:1002-1302(2020)13-0076-04

甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)作为我国传统的大宗中药材,本身也是一种可综合利用的经济型植物。但迄今为止,有关甘草不同组织总 RNA 的提取报道甚少。这主要是由于甘草叶片、茎干中蛋白质、脂肪、多糖等含量均很高,刺毛状腺体中还含有大量黏液质^[1]。根和根茎中有甘草酸等丰富的次生代谢产物,致使提取甘草的 RNA 比一般的植物要困难,通过这些方法提取的 RNA 多适用于后期的逆转录 PCR(PT-PCR)等试验,很少用于转录组测序^[1-3]。针对这类植物,相关学者通过调整试验方式,结合不同方法以及加入不同的物质来提高植物 RNA 的提取率,例如陈华等使用改良 Trizol 法结合 LiCl 法提取了番茄叶片的 RNA^[4]。

高压静电技术是近几十年兴起的一种重要的处理种子的方法^[5]。利用其能够击穿组织细胞壁和细胞膜的特征,从而提高种子的活化能,调节内部水分子、腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)含量、酶活性等,优化原有性质,增强种子的生理生化反应^[6-7],提高种子活力,与此同时降低植物的发病率并提高

其抗逆能力^[8]。本试验以甘草幼叶、嫩茎、种子为材料,选用十二烷基苯磺酸钠(SDS)法、Trizol 法、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取总 RNA,期望找到一种提取甘草 RNA 的最佳方法,并能达到转录测序要求,并探究高压静电场对甘草 RNA 含量的影响,以便为后续相关分子水平研究提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 材料及处理采集

1.1.1 试剂材料 甘草种子,选用人工栽培的乌拉尔甘草,购自内蒙古赤峰生态甘草种植基地;甘草完整植株取自笔者所在课题组实验室组织培养的甘草苗。供试试剂:Trizol[天根生化科技(北京)有限公司],CTAB、焦碳酸二乙酯(DEPC)、SDS、酚-三氯甲烷、异戊醇、异丙醇、乙醇、无 RNA 酶水(内蒙古鸿之惠商贸有限公司)。

1.1.2 材料处理 挑选饱满的甘草种子,于 98% 浓硫酸溶液中处理 10 min,用无菌水洗涤 3~4 次,洗净种子表面残留酸液,晾干。将经浓硫酸处理过的种子分成若干份,进行高压静电场处理。高压静电场电压的选取是在笔者所在课题组研究基础上进行筛选的,电压依次为 0(CK)、12、15、18 kV,处理时间为 25 min(CK 处理为 0 min)。高压静电场处理完之后,置于 10% 次氯酸钠溶液中 15 min,用无菌水洗涤数次,晾干备用。播种于 MS 培养基中,

收稿日期:2019-08-10

基金项目:国家自然科学基金(编号:51467014)。

作者简介:李 倩(1993—),女,河北张家口人,硕士,主要从事环境生物物理和分子技术研究。E-mail:934192500@qq.com。

通信作者:郭九峰,博士,教授,硕士生导师,主要从事生物物理与生物技术研究。E-mail:guojf101@sina.com。

MS 培养基生长条件为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, 光照黑暗比为 12 h : 12 h。取生长 7 d 的甘草苗进行处理, 每种处理重复 3 次, 1 次重复包含 10 颗幼苗^[9-12]。

1.2 试验方法

1.2.1 RNA 的提取 在 RNA 提取过程中, 分别采用 CTAB 法、SDS 法和 Trizol 法。CTAB 法参照王杰等的方法^[13-14], 并在此基础上根据甘草的特性加以调整; SDS 法参考尹慧等的方法^[15-16], 在试验过程中, 为更好地适用于甘草, 将个别试验试剂和步骤进行更改; 试验中采用的 Trizol 法以说明书步骤为基础, 具体操作步骤在试验中有略微改动。

1.2.2 总 RNA 检测及纯度分析 纯度检测: 用微量分光光度计对 RNA 样品进行纯度和浓度的检测。记录 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 、 $D_{230\text{ nm}}/D_{260\text{ nm}}$, 一般来说, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 在 1.8 ~ 2.1 之间最佳。

质量检测: 使用 1% 琼脂糖的非变性凝胶电泳进行 RNA 质量检测, 用凝胶成像系统拍照记录, 观察 28S 和 18S 条带的完整性以及亮度。

1.2.3 反转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 分析

引物设计: 按照 GenBank 甘草 *Actin* 基因序列 GQ404511 设计内参引物, F: 5'-GTTGCCTTGATTA TGAA-3', R: 5'-TCGAGTTGTAGGTGGTCT-3'^[17]。

逆转录反应: 取 2 μL 甘草不同组织总 RNA 样品于 PCR 管, 加入 2 μL 5 \times PrimeScript^{RT} Master Mix, 用无 RNA 酶水补足至 10 μL 。37 $^\circ\text{C}$ 条件下孵育 15 min, 85 $^\circ\text{C}$ 条件下加热 1 min 后终止反应。4 $^\circ\text{C}$ 冷却 1 min 后, 4 500 r/min 离心 1 min。合成的第一链 cDNA 用于下一步 PCR 反应, -20 $^\circ\text{C}$ 条件下保存备用。

PCR 反应: 反应体系为 *Taq* 酶 0.25 μL , 上下游引物各 1.00 μL , 10 \times PCR 缓冲液 5 μL , dNTP Mixture 4 μL , 模板 cDNA 1.5 μL , 无 RNA 酶水补足至 50 μL 。反应程序为 95 $^\circ\text{C}$ 预变性 3 min; 95 $^\circ\text{C}$ 变性 1 min, 56 $^\circ\text{C}$ 退火 40 s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 2 min, 30 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 5 min; 4 $^\circ\text{C}$ 保存。扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 RNA 含量测定方法 通过紫外分光光度法, 使用紫外分光光度计^[18-20]测量 $D_{260\text{ nm}}$, 并根据公式(1)计算上清液中的总 RNA 含量:

$$\rho_{\text{RNA}} = D_{260\text{ nm}} \times k \times 40. \quad (1)$$

式中: ρ_{RNA} 是总 RNA 的质量浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$; k 是 RNA 的稀释倍数; 40 是 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 核苷酸的消光系数。每次测定重复 3 次, 求平均值。

1.2.5 降解 RNA 含量测定方法 在 2 mL 待测样品溶液中加入相同体积的 RNA 沉淀剂, 置于 4 $^\circ\text{C}$ 反应 1.25 h, 10 800 r/min 离心 3 min, 取上清液稀释到预试验中找到的最适合倍数, 测定该液在 260 nm 处的吸光度^[20-21], 根据公式(2)计算上清液中 RNA 降解的含量

$$5' - \text{核苷酸含量} (\mu\text{g}/\text{mL}) = \frac{D_{260\text{ nm}} \times 4 \times \alpha}{40}. \quad (2)$$

式中: α 为 RNA 的稀释倍数。每次测定重复 3 次, 求平均值。

2 结果与讨论

2.1 RNA 完整性检测

2.1.1 纯度、浓度检测 纯度、浓度检测结果见表 1、图 1、图 2。

表 1 不同方法提取 RNA 纯度、浓度检测结果

方法	组织	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$	RNA 质量浓度 ($\text{ng}/\mu\text{L}$)
SDS 法	幼叶	2.066	1 256
	嫩茎	2.012	1 043
	种子	1.967	878
CTAB 法	幼叶	2.034	1 027
	嫩茎	2.017	988
	种子	1.892	367
Trizol 法	幼叶	2.033	899
	嫩茎	1.878	654
	种子	1.798	769

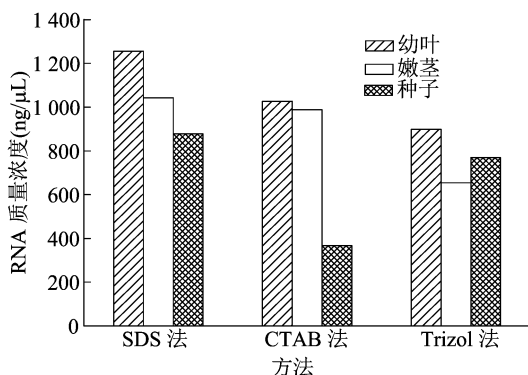


图 1 3 种方法提取 RNA 的质量浓度比较

2.1.2 质量检测 通过观察琼脂糖凝胶图谱判断 SDS 法、CTAB 法、Trizol 法提取的甘草组织总 RNA 的质量。从电泳结果 (图 3) 可判断 RNA 有无降解及降解程度、是否有 DNA 污染及 RNA 的完整性。

由图 3 可知, SDS 法提取的甘草幼叶、嫩茎和种子总 RNA, 28S 和 18S 条带清晰明亮, 5S 条带较浅,

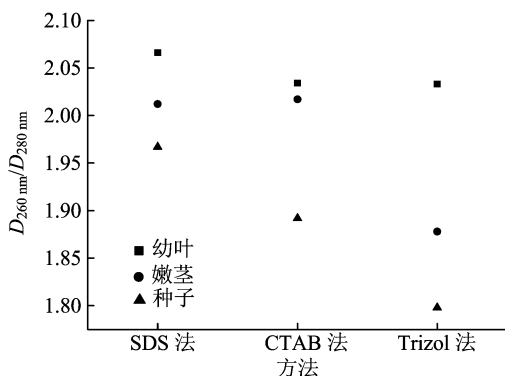


图2 3种方法提取 RNA 的纯度比较

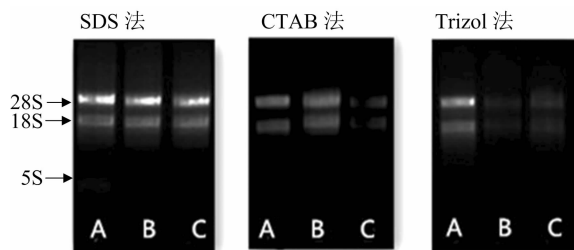


图3 3种 RNA 提取方法电泳图谱

表明提取的总 RNA 完整性好。CTAB 法得到的凝胶电泳图谱中,幼叶的整体效果不错,但嫩茎的条带有些许弥散,可能是 DNA 污染造成的;种子的条带完整但亮度偏暗,可能是沉降过程不完全所致,或有其他物质轻微干扰所致。Trizol 法提取甘草幼叶、嫩茎和种子总 RNA 过程中,出现溶液褐化现象,幼叶的最终提取产物中稍有影响,但整体影响不大。而嫩茎和种子中 RNA 存在量微乎其微,整体完整性略低,质量差。因此,通过 3 种方法分析比较,SDS 法是提取甘草 RNA 的最佳方法。

2.2 SDS 法提取不同高压静电场处理甘草苗的 RNA 检测

采用 SDS 法提取经由不同高压静电场处理的甘草苗的 RNA,电泳结果见图 4,条带清晰、明亮。18 kV 和 CK 条件下(泳道 3 和泳道 4)条带孔位有些明亮,考虑可能有沉淀未洗脱完全。经电场处理的泳道条带比 CK 清晰明亮,说明经高压静电场处理对甘草 RNA 的提取起到了一定的促进作用。

2.3 SDS 法的 PCR 验证

采用 SDS 法得到的不同高压静电场处理的甘草幼叶、嫩茎和种子 RNA 进行逆转录反应,以 RT-PCR 得到的第一链 cDNA 作为模板,以甘草 *Actin* 基因设计引物对,进行 PCR 扩增,结果见图 5。不同高压静电场处理的甘草的幼叶、嫩茎和种子都出现了目的条带,扩增效果理想,条带清晰明显,没有一点

拖带,进一步说明 SDS 法是甘草 RNA 提取的最佳方法,同时高压静电场的加入也优化了高质量 RNA 的获得。

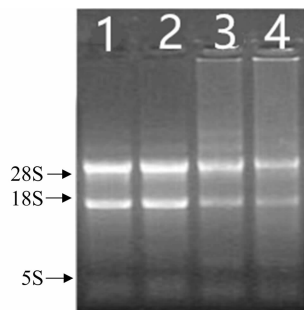


图4 4种高压静电场处理 RNA 电泳图谱

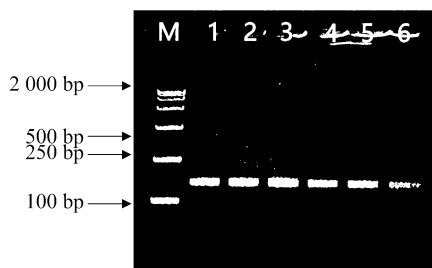


图5 SDS 法 RT-PCR 扩增产物电泳结果

2.4 RNA 含量与电场强度的关系

使用 SDS 法提取甘草种子经电场处理和对照组分别生长 1、3、5、7、9、11 d 的 RNA,检测不同高压静电场对甘草 RNA 的影响(图 6)。

不同高压静电场处理在不同生长时间里, RNA 含量呈现不同的变化趋势。随着生长时间的延长,经高压静电场处理的 RNA 含量出现不同程度的波动变化,在 15、18 kV 条件下整体波动上升,12 kV 条件下,在一定范围之内波动下降,而 CK 组出现大范围波动下降。随着电场强度增加, RNA 的含量也出现波动变化,综合观察来看,当处理所用高压静电场强度为 18 kV 时,甘草生长到 9 d 时, RNA 含量最大,并且此时 RNA 降解量最少。因此,确定 18 kV 为最佳电场强度。

3 讨论与结论

纯度高、完整性好的 RNA 是进行 RT-PCR、荧光定量 Real-time PCR、转录组测序、基因表达分析等的基础^[22-23]。甘草是一种经济型综合利用的植物,由于其本身有大量蛋白质、多糖,茎叶的刺毛状腺体中还含有大量黏液质,根和根茎中又有丰富的

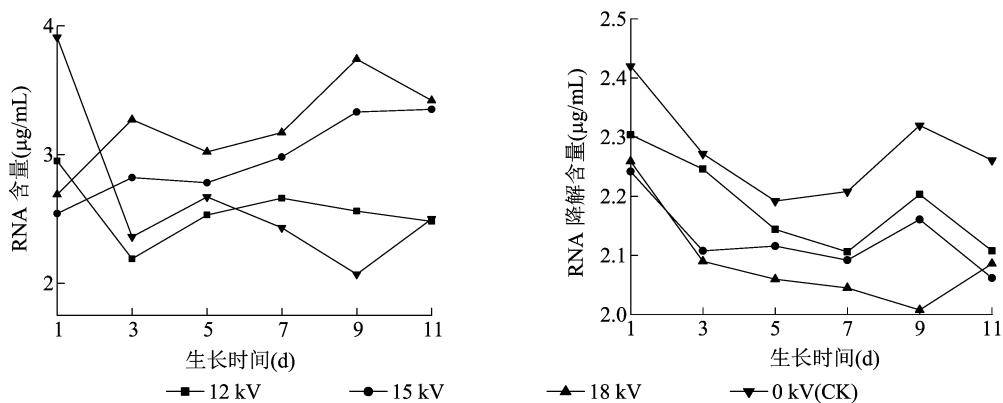


图6 高压静电场强度对不同生长时间甘草 RNA 含量和 RNA 降解含量的影响

次生代谢产物,提取甘草 RNA 面临一定的困难。Trizol 法是一种简单快速提取 RNA 的方法,试验中溶液褐化现象,可能与试剂中含有氧化性物质有关,在去除杂质的同时也会造成 RNA 的损失,所以 Trizol 法不适合甘草这类植物 RNA 的提取。CTAB 法能够摒弃试验过程中的部分氧化还原情况,但是其操作复杂,操作过程温度区间涉及广,容易造成降解。因此,并不是提取甘草 RNA 的最佳方法。SDS 法既能克服 Trizol 法的一些弊端,又比 CTAB 法操作简单,且成本不高,能够获得高质量的 RNA。因此,SDS 法是甘草不同组织 RNA 提取的最佳选择。高压静电场是近几十年来兴起的且用途广泛的一门技术^[5],本试验通过加入高压静电场的处理,结果表明,甘草组织中 RNA 的获得率确有提高,说明高压静电场处理促进了 RNA 的提取。目前为止,有关电场对植物的处理效应详尽的机制尚未有明确的定论,可能的分析方向类型有细胞膜电穿孔模型、电崩解模型、影响酶的活性^[24-27]、影响遗传物质^[28-29]等。本研究结果表明,高压静电场处理甘草之后,组织中 RNA 发生了明显的变化,这也验证了高压静电场影响遗传物质的说法。

本试验研究了不同 RNA 提取方法对甘草的适用性,并以此为基础探究高压静电场处理对甘草生长过程中 RNA 含量的影响。存在于自然界的所有生物体都拥有特异的生理特性和电磁效应,试验证明,高压静电场处理对甘草 RNA 的提取有促进作用,这可能也为高质量 RNA 的获得提供一种可能。想要全面、深层次地探究高压静电场对甘草 RNA 的影响机制,未来学者可以以此为切入点从不同层次进行探究。

参考文献:

[1]刘春生,王文全. 甘草不同器官 RNA 提取方法研究[J]. 北京中医药大学学报,2006,29(10):705-707.

[2]张 卉,王文全,杨 全. 甘草 RNA 提取方法研究[J]. 时珍国医国药,2007,18(12):3051-3052.

[3]许恒飞. 胀果甘草细胞培养及查尔酮合成酶基因的 cDNA 克隆[D]. 保定:河北大学,2008.

[4]陈 华,昌 伟,杨 瑞,等. 番茄叶片小 RNA 提取方法的优化[J]. 北京农学院学报,2012,27(3):4-6.

[5]周盛祥,李法德,张春庆,等. 高压静电场处理种子研究现状与发展对策[J]. 农业工程,2016,6(4):88-91.

[6]黄洪云,杜 宁,张 璇. 高压静电处理对种子萌发的生理生化影响[J]. 种子,2017,36(12):74-76.

[7]韩德恩. 静电场处理植物种子和植株的效应[J]. 湖北农业科学,1999(5):26-27,37.

[8]吴宗汉. 基础静电学[M]. 北京:北京大学出版社,2010:254-255.

[9]满淑丽,刘延涛,张 咪,等. 甘草组培与栽培主要成分的提取及活性比较[J]. 天津科技大学学报,2015,30(4):17-20.

[10]苏 珊. 优质甘草组培快繁及遗传稳定性分析[D]. 石家庄:河北科技大学,2015.

[11]梁玉勇,李雪娇,尹双双,等. 甘草组培苗的培养基优化及其有效成分分析[J]. 贵州农业科学,2012,40(11):29-33.

[12]杨 瑞,王礼强,刘 颖. 甘草组织培养的研究进展[J]. 中草药,2014,45(12):1796-1802.

[13]王 杰,王 全,田 娜,等. 不同植物组织 RNA 提取方法的比较分析[J]. 北京农学院学报,2015,30(1):76-80.

[14]陶 倩,范慧艳,张水利,等. 南方红豆杉不同组织总 RNA 提取方法研究[J]. 中华中医药杂志,2018,33(8):3336-3341.

[15]尹 慧,陈 莉,李晚艳,等. 百合叶片总 RNA 提取方法比较及优化[J]. 中国农业大学学报,2008,13(4):41-45.

[16]张志勇,阳 静,齐泽民. 铁皮石斛总 RNA 提取方法的比较研究[J]. 江苏农业科学,2017,45(4):33-35.

[17]王 芳. 甘草肌动蛋白基因 *GuActin2* 的克隆和表达分析[J]. 植物生理学通讯,2009,45(10):995-1000.

[18]宋大伟. 啤酒废酵母提取 RNA 工艺研究[D]. 长春:吉林大学,2006.

[19]林松毅,李海霞,平 红,等. 超声波破壁释放啤酒废酵母细胞中核糖核酸的实验研究[J]. 食品科技,2009,34(5):107-109.

[20]刘静波,于一丁,王 睦,等. 高压脉冲电场促进啤酒酵母细胞 RNA 快速溶出的技术[J]. 吉林大学学报(工学版),2010,40(4):1171-1176.

李志红,徐静雅,旦真次仁,等.白芨工厂化育苗组培快繁技术体系的构建[J].江苏农业科学,2020,48(13):80-83.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.13.016

白芨工厂化育苗组培快繁技术体系的构建

李志红^{1,2},徐静雅^{1,2},旦真次仁³,段金华⁴,侯典云^{1,2}

(1.河南科技大学农学院,河南洛阳 471000;2.洛阳市道地药材繁育与创新利用工程技术研究中心,河南洛阳 471000;
3.林芝市科技开发交流服务中心,西藏林芝 860000;4.米林县红太阳科技示范家庭农场,西藏米林 860500)

摘要:白芨的野生资源濒临匮乏,其种子自然萌发比较困难,因此传统的白芨种植方法已不适于市场需求。以白芨种子为材料,探究白芨种子萌发、生根及组培苗移栽驯化的最佳方法。白芨种子萌发最佳培养基为 MS + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 8 g/L + 马铃薯 10 g/L,增殖培养基为 MS + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 9 g/L + KT 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L,最佳生根培养基为 MS + NAA 0.2 mg/L + IAA 1.0 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 9 g/L + 马铃薯 25 g/L,马铃薯可促进白芨组培苗根的生长,组培苗驯化的最佳处理为预先将培养瓶开瓶进行适应性锻炼,2~3 d 后把组培苗移至炼苗基质中,这样可提高白芨组培苗的成活率。白芨工厂化育苗体系的建立可有效地扩大白芨的种植规模,缩短育苗时间,从而更好地利用和保护白芨野生资源。

关键词:白芨;组织培养;快速繁殖;种子萌发率;组培苗;丛生芽;生根率;成活率

中图分类号:S567.23+9.043 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)13-0080-04

白芨 [*Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f.] 为兰科多年生草本植物,其干燥块茎入药,具有收敛止血、消肿生肌的功效,可用于治疗吐血、外伤出血、皮肤皲裂等症^[1],还具有很高的园林观赏价值^[2]。现代药理研究表明,白芨具有抗菌^[3]、止血^[4-5]、促进创伤愈合^[6]、抗肿瘤^[7-8]等作用。研究表明,白芨的主要化学成分是多糖、三萜及皂苷等^[9-10]。白芨在我国分布较为广泛,在云南、广西、甘肃、贵州等地均有发现^[11]。近年来市场对白芨的需求量不断

加大,导致野生白芨遭到过度的开采,野生资源急剧减少,现已是国家重点保护的野生药用植物^[12]。但白芨的常规种植却受到很大的限制,每个白芨蒴果内大约有几万颗种子,种子细小且无胚乳,自然条件下出苗率只有万分之一^[13]。目前主要是依靠人工栽培的方法来增加白芨的产量,但这种方法不仅周期长,且白芨易染病害,不能满足大规模栽培的需要^[14]。利用组织培养技术对白芨外植体进行离体培养,不仅可实现工厂化育苗选育白芨优良品种,而且可保护白芨野生资源^[15]。

1 材料与方法

1.1 材料处理

选取未开裂的白芨成熟蒴果,用 75% 乙醇棉球擦拭表面后,在超净工作台内,用 75% 乙醇浸泡 30 s 后取出,用 0.1% 的氯化汞溶液浸泡 6 min 后,

收稿日期:2019-08-30

基金项目:国家自然科学基金(编号:1404829);西藏自治区重点科技计划(编号:2015-ZD-NM-0)。

作者简介:李志红(1996—),女,河南新乡人,硕士,主要从事药用植物分子生物学研究。E-mail:1600356814@qq.com。

通信作者:侯典云,博士,副教授,硕士生导师,主要从事药用植物资源评价与利用研究。E-mail:dianyun518@163.com。

[21]徐 焱. 5'-核苷酸制备工艺的研究[D]. 南京:南京工业大学,2002.

[22]张玉刚,成建红,韩振海,等. 小金海棠总 RNA 提取方法比较及 cDNA 的 LD-PCR 扩增[J]. 生物技术通报,2005(4):50-53.

[23]关 玲,赵密珍,王庆莲,等. 改良 CTAB 方法提取果树不同组织的 RNA[J]. 江苏农业科学,2018,46(15):19-22.

[24]张佰清,郭佳佳. 脉冲强光对大肠杆菌细胞膜损伤及胞内酶活性的影响[J]. 食品与机械,2010,26(5):62-64,83.

[25]王 婷,何荣海,马海乐. 物理场对酶活力的影响[J]. 食品工

业科技,2010,31(6):401-403,407.

[26]田美玲. 高压脉冲电场(PEF)激活 α -淀粉酶/葡萄糖淀粉酶/果胶酶的比较研究[D]. 重庆:西南大学,2016.

[27]黄 薇. 物理场作用下的蛋白质折叠和酶催化研究[D]. 天津:南开大学,2014.

[28]刘 瑶. 电场处理柠条种子对于干旱胁迫下幼叶基因表达影响的初步研究[D]. 呼和浩特:内蒙古大学,2013.

[29]刘翔宇. 不同电场条件处理巧条种子对于干旱条件下幼叶基因表达的影响[D]. 呼和浩特:内蒙古大学,2015.