



高温胁迫下半夏叶片总 RNA 变化及 mRNA 差异表达的研究

薛建平^{1,2*}, 吴林¹, 盛玮^{1,2}, 张爱民^{1,2}, 李国兴¹, 常莉^{1,2}, 宋运贤^{1,2}, 陶兴魁¹

(1. 淮北师范大学 生命科学学院, 安徽 淮北 235000;

2. 资源植物生物学安徽省重点实验室, 安徽 淮北 235000)

[摘要] 目的:分析半夏高温倒苗过程中总 RNA 及 mRNA 差异表达的变化规律,为研究半夏高温倒苗的分子机制提供了信息。方法:经过不同时间的高温胁迫处理,测定半夏叶片总 RNA 含量变化和 mRNA 表达的差异。结果:半夏叶片总 RNA 的含量变化分为 3 个降低阶段和 2 个升高阶段,胁迫 0,6 h 时含量最高,胁迫 4,42 h 和倒苗时含量最低,差异显示表明胁迫 6 h 的样品条带多态性和带型与 0 h 的接近,其余胁迫时间的样品条带远少于 0,6 h 时的样品条带,并且在不同的样品之间均有 mRNA 差异条带出现。结论:在半夏经高温胁迫而倒苗的过程中,基因表达开启与关闭和基因表达增强与减弱模式具有一定的规律,并且可能启动了不同的基因表达系统。

[关键词] 半夏;高温胁迫;总 RNA 含量;mRNA 差异表达

半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 为天南星科半夏属多年生宿根草本植物,是一种重要的中药材。半夏生长适宜温度为 15~25℃,超过 26℃ 植株生长受阻,持续在 30℃ 以上时容易倒苗,从而缩短营养生长期,导致其产量降低。在实际生产中,高温引起半夏倒苗直接导致了其产量的降低^[1]。目前,由于对半夏高温倒苗分子机制了解的欠缺,人工调控技术发展缓慢,从而严重制约了半夏生产的发展^[2]。因此,深入研究高温胁迫下半夏倒苗的分子机制及调控,对于半夏栽培和产业的发展等具有十分重要的意义。植物在高温胁迫下,会受到相关基因的表达调控,而基因表达必然涉及到 RNA 的合成^[3]。尽管目前还不清楚半夏倒苗过程中涉及到多少基因,哪些基因直接导致了半夏倒苗,但高温胁迫过程中 RNA 含量的变化可以从一定程度上反映基因的表达,并通过差异显示可直观区分一些差异表达片段。因此,通过对半夏高温胁迫不同时间段 RNA 表达量的差异及差异表达片断的变化分析,从而为研究半夏高温胁迫倒苗的分子机制提供信息。

1 材料

半夏种源采自南湖开发区高科技农业示范中心国家“半夏人工种子中试”基地,经淮北师范大学生命科学学院薛建平教授鉴定为天南星科植物半夏 *P. ternata* 的块茎。选择大小均一的块茎种于盆钵内,在温度为(25±1)℃,光照时间为每天 12 h,强度 3 000 lx 的人工气候箱中培养,待苗高 15 cm 左右时给予(35±1)℃ 的高温胁迫,光照时间和强度不变。分别在高温胁迫 0,0.5,1,2,4,6 h 以及后续每 6 h 直至倒苗时取半夏叶片各 3 g,快速清洁后,迅速置于液氮中,备用。

2 方法

2.1 RNA 抽提 RNA 抽提采用改良的皂土提取法^[4], -70℃ 保存。

2.2 总 RNA 质量检测 and 浓度测定 用紫外分光光度计测定吸光度 A_{230} , A_{260} , A_{280} , 在 1.0% 的非变性琼脂糖凝胶上电泳检测完整性。根据所得 A_{260} 值换算单位体积的浓度,再根据取样鲜重换算成 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 的总 RNA 浓度。

2.3 DDRT-PCR 绘制总 RNA 含量变化图,选取含量差异较大的几组样品的总 RNA,用 DNaseI 除去 DNA 后进行 DDRT-PCR。PCR 仪为 PTC-200 型 (Alpha Vnit Block Assembly, USA),引物购自上海生工生物工程技术有限公司。

以 1 μg 总 RNA 为模板,按照大连宝生生物工

[稿件编号] 20091130002

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973963);安徽省自然科学基金项目(090413252);安徽高校省级自然科学研究重点项目(KJ2009A160)

[通信作者] *薛建平, Tel: (0561) 3802025, E-mail: xuejp2000@yahoo.com.cn



程公司的反转录酶的使用说明书,用反转录酶和引物 AAGCT₁₀G 或 AAGCT₁₀A 合成 cDNA。然后以合成的 cDNA 为模板用锚定引物 AAGCT₁₀G 或 AAGCT₁₀A 和一些随即引物如 5'-CTGCTTGATG-3', 5'-GATCAATCGC-3' 进行 PCR 扩增。PCR 反应条件:94 ℃ 2 min;94 ℃ 40 s,40 ℃ 40 s,72 ℃ 2 min, 35 个循环;72 ℃ 延伸 5 min,4 ℃ 保存。

PCR 产物采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后银染,电泳和银染方法采用田振东等^[5]介绍的方法。取 6 μL PCR 产物加入 4 μL 2 × DNA 上样缓冲液,在 6% 非变性聚丙烯酰胺胶垂直板(20 cm × 30 cm)上用 1 × TBE 电泳缓冲液电泳,先于 250 V/10 W 预电泳 30 min,然后上样电泳 4 ~ 5 h,直至溴酚蓝离胶底 1.5 cm。

电泳完毕取下胶板,揭去凹槽一侧玻璃板,将胶块连同一侧玻璃板一并放入去离子水中漂 20 ~ 30 min,固定液(10% 乙醇 + 0.5% NaAc)中固定 3 min,染色液(10% 乙醇 + 0.5% NaAc + 0.2% AgNO₃)中

染色 5 min,去离子水中漂洗 3 ~ 5 min,显色液(3% NaOH + 0.5% 甲醛)中显色 5 ~ 10 min。

3 结果与分析

3.1 总 RNA 质量 1.0% 的非变性琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示提取出的总 RNA 18S,28S 带型清晰无弥散,加样孔内干净,说明完整性好,无降解发生,见图 1。 A_{260}/A_{280} 是 1.8 ~ 2.0, A_{260}/A_{230} 大于 2.0,见表 1,说明所提 RNA 无蛋白质和多酚污染。



从左到右 1 个泳道检测 1 个样品,各个样品经受高温胁迫的时间各不相同。

图 1 高温胁迫不同时期的半夏叶片总 RNA 电泳检测

表 1 高温胁迫不同时期半夏叶片总 RNA 含量和吸光度

胁迫时间/h	A_{260}	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	总 RNA / $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
0	0.575 7	1.863	2.231	345.60
0.5	0.483 0	1.896	2.261	289.80
1	0.448 0	1.875	2.163	268.80
2	0.425 0	1.925	2.253	255.00
4	0.360 6	1.910	2.378	216.36
6	0.581 6	1.893	2.145	348.96
12	0.559 5	1.872	2.379	335.70
18	0.441 6	1.865	2.210	264.96
24	0.435 0	1.956	2.398	261.00
30	0.367 0	1.862	2.225	220.20
36	0.304 0	1.945	2.187	182.40
42	0.302 6	1.958	2.264	181.56
48	0.458 0	1.902	2.269	274.80
54	0.374 0	1.867	2.345	224.40
60	0.348 0	1.921	2.315	208.80
66	0.336 0	1.877	2.162	201.60
72	0.274 0	1.958	2.378	164.40
78	0.183 0	1.886	2.335	109.80
84	0.152 1	1.915	2.233	91.23

3.2 高温胁迫过程中总 RNA 含量的变化趋势 半夏高温胁迫的整个过程中,叶片由绿变黄,84 h 叶片全部变黄、倒苗,且在不同胁迫时间的样品其总 RNA 含量有着较大差异,但总 RNA 含量变化的总趋势是降低的。可以把这一过程总 RNA 的含量变

化分为 3 个降低阶段和 2 个升高阶段,见图 2。当然,在每个降低或升高阶段也可能包含升高或降低的过程,而这里只考虑每个阶段整体显示的趋势。

3 个降低的阶段分别是 0 ~ 4, 6 ~ 36, 48 ~ 84 h 全部倒苗时。对于变化的速度以每小时的变化量为

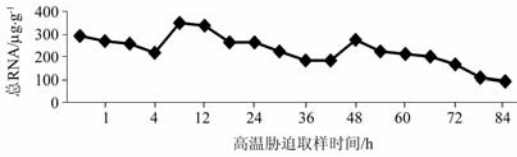
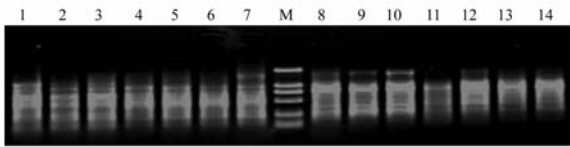


图 2 总 RNA 含量变化

标准。在高温胁迫的 0~4 h,总 RNA 在 4 h 之内由 345.6 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 降至 216.36 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,降低速度较快,幅度也较大。在 6~36 h 时,总 RNA 从 348.96 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 降至 36 h 的 182.4 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,虽然降低幅度较大,但降低速度却远低于前一个降低阶段。48~84 h 全部倒苗时,其降低速度又低于 6~36 h 阶段。总 RNA 含量 2 个升高阶段为 4~6,42~48 h,前一阶段升高的幅度和速度均高于后一个阶段。

3.3 DDRT-PCR 结果及差异条带的获得 用不同的引物组合进行的 PCR 反应,结果显示以引物组合 5' AAGCT₁₀ A3', 5' CTGCTTGATG3' 和引物组 5' AAGCT₁₀ A3', 5' GATCAATCGC3' 进行扩增的产物条带带型丰富,亮度高,说明用这 2 对引物组合进行的 DDRT-PCR 效果好,见图 3。

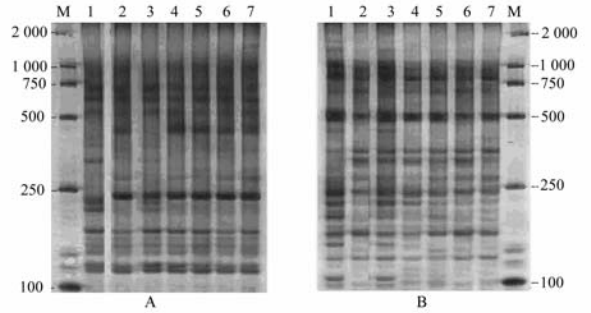


1~14. 以不同的反转录产物 cDNA 为模板,以 5'-AAGCT₁₀ A-3' 为锚定引物;1~7. 以 5'-CTGCTTGATG-3' 为随机引物;8~14. 5'-GATCAATCGC-3' 为随机引物;M. 2 000 DL maker。

图 3 PCR 产物电泳检测

从差异显示的电泳图可以看到,0 h 的样品条带丰富,在 4 h 的样品的条带数量少于 0 h,但有新的条带出现,说明在 4 h 时许多基因停止表达,并出现新的基因表达;而 6 h 的条带多态性和带型与 0 h 的接近,但也有不同于其他样品的条带出现,并且有些在 4 h 出现的条带此时没有出现,说明原先停止表达的基因又重新开启,并且在出现一些新的基因表达同时也关闭了一些基因表达。后面的几个样品的条带数远少于 0 h 和 6 h 的,但有些条带带型与前几个样品一致,并有新的条带出现,说明大多数基因停止表达的同时又有新的基因表达发生或重新开启一些基因表达。另外,对于同一大小的条带在不同

的时间段,有的信号强,有的信号弱,说明这一基因在不同的时间表达强度不同,见图 4。



A. 以 5'-AAGCT₁₀ A-3' 和 5'-CTGCTTGATG-3' 为引物组合的 PCR 产物;B. 以 5'-AAGCT₁₀ A-3' 和 5'-GATCAATCGC-3' 为引物组合的 PCR 产物;泳道 1~7. 表示高温胁迫 0,4,6,36,48,60,84 h 时的样品;泳道 M. 为 2 000 DL maker。

图 4 PCR 产物的非变性聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳

4 讨论

早期研究发现,在高于正常生长温度 5 $^{\circ}\text{C}$ 以上的环境下,生物体大多数正常蛋白质的合成和 mRNA 的转录受到抑制或终止,同时热激蛋白基因 (heat shock gene) 则被快速启动表达,迅速合成一系列热激蛋白 (heat shock proteins, HSPs) [6],合成的热激蛋白具有保护作用、分子伴侣作用和调节功能,保护生物组织和细胞免受高温伤害的重要作用,以使机体适应高温逆境的过程 [7]。并且有一类 smHSPs 的积累随着热激温度与持续时间的增加而增高,其最高表达量出现的时间恰恰在胁迫程度最强时 [8]。

本试验中半夏经高温胁迫的 0~4 h 总 RNA 含量的降低,可能是高温胁迫下半夏大多数正常蛋白质基因的转录被抑制,正常温度下存在的大多数 mRNA 的翻译降低或停止,同时 HSP 基因转录被激活的过程。在这一段时间内,被激活的 HSP 基因的数量远小于正常蛋白质基因关闭表达的数量,所以总 RNA 含量是降低的。而随着 HSP 基因转录被激活,热激蛋白不断产生和积累,发挥它的功能,其分子伴侣作用可修复热损伤的蛋白,当热激蛋白积累到一定数量,修复了热损伤蛋白,对半夏组织细胞具备了一定的保护能力时,先前关闭的基因表达会重新开启。同时,由于高温会引起生物体产生 $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 等有毒害物质的积累,达到一定程度时,可诱导保护酶系统活力,一些保护酶显著增加 [9],其基因表



达必然会增强,以维持正常的新陈代谢。由于上述基因表达重新开启与增强,使得此时半夏总RNA含量显著上升(4~6,42~48 h)。另外,本试验中高温胁迫的6~36 h半夏总RNA含量降低的阶段,可能是由于随着高温胁迫的持续进行,热激蛋白不足以提供保护作用,大多数mRNA的翻译降低或停止,使得总RNA含量再次降低。但植物体在经过热激后会获得一定的耐热性^[10],所以总RNA含量的降低速度比0~4 h阶段低。后续高温胁迫过程中又出现总RNA含量的显著上升和下降,变化趋势与前几个阶段类似,但由于持续的高温,部分组织和细胞受到伤害致死,使得基因表达的转录成RNA的量会减少,在48 h的总RNA含量达不到最高值。在48 h以后总RNA降低的过程一方面和前几阶段降低过程类似,另一方面还可能由于此阶段细胞大多数死亡而导致总RNA含量持续下降至最低。

郭巧生等^[11]研究表明,半夏植株经高温处理后,半夏SOD活性先增高后下降,MDA含量持续升高,根系活力则显著下降。因此,本试验获得的mRNA差异表达片断是否和SOD酶、MDA合成以及根系生理活动等有关基因的表达有着密切关系,值得深入研究。

[参考文献]

- [1] 郭巧生,贺善安,刘丽. 半夏种内不同居群生长节律的研究[J]. 中国中药杂志,2001,26(4):233.
- [2] 薛建平,张爱民,方中明,等. 水杨酸对半夏植株生长的影响[J]. 中国中药杂志,2007,32(12):1134.
- [3] Jiang T, Faith C B, Bingru H. Identification of heat stress-responsive genes in heat-adapted thermal *Agrostis scabra* by suppression subtractive hybridization[J]. Plant Physiol, 2008, 102: 481.
- [4] 吴林,薛建平,徐有明,等. 半夏叶片总RNA提取方法及效果的比较[J]. 中草药,2008,39(11):1723.
- [5] 田振东,柳俊,谢从华,等. DDRT-PCR与反向Northern杂交技术结合分离马铃薯mRNA差异表达片段[J]. 农业生物技术学报,2003,11(5):545.
- [6] Tissieres A, Mitchell A K. Some new proteins induced by temperature shock in drosophils[J]. Mol Boil, 1974, 84: 389.
- [7] 计红,杨焕民,吴永魁. 热应激蛋白研究进展及其应用前景[J]. 生物学杂志,2005,22(4):1.
- [8] Plwssset J, Ludwig J R, Cox B S, et al. Effect of cell cycle position on thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. J Bacteriol, 1987, 169: 779.
- [9] 薛建平,丁勇,张爱民,等. 高温胁迫下半夏倒苗前后保护酶活力的变化[J]. 中国中药杂志,2004,29(7):641.
- [10] 周人纲,樊志和,李晓芝,等. 热锻炼对小麦叶片细胞膜及有关酶活性的影响[J]. 作物学报,1995,21:568.
- [11] 郭巧生,张君毅,易茜茜,等. 半夏不同居群根系活力和生化指标对高温胁迫的响应[J]. 中国中药杂志,2007,32(15):1508.

Changes of total RNA and mRNA differential expressions in leaves of *Pinellia ternata* under high temperature stress

XUE Jianping^{1,2*}, WU Lin¹, SHENG Wei^{1,2}, ZHANG Aimin^{1,2}, LI Guoxing¹, CHANG Li^{1,2}, SONG Yunxian^{1,2}, TAO Xingkui¹
(1. School of Life Science, Huaibei Normal University, Huaibei 235000, China;
2. Anhui Key Laboratory of Plant Resources and Biology, Huaibei 235000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the total RNA and mRNA differential expression in leaves of *Pinellia ternata* under high temperature, provide more information of the molecular mechanism of the sprout tumble. **Method:** The total RNA and mRNA differential expression in leaves of *P. ternata* at different stress time was analyzed. **Result:** The results showed that the trend of total RNA content was divided into three descending stages and two ascending stages, the total RNA content was the highest at 0, 6 h, but it was the lowest at and 42 h, as well as when the sprout tumbled. The differential display showed that the polymorphism and type of bands of the sample at 6 h were similar to those at 0 h. But the bands numbers at other time were far less than those at 0, 6 h. And there were some different mRNA differential expression bands between the different samples. **Conclusion:** In the process of the sprout tumble caused by high temperature stress, the RNA and mRNA differential expression in leaves of *P. ternata* changed.

[Key words] *Pinellia ternata*; high temperature stress; total RNA content; mRNA differential expression

doi: 10.4268/cjcm20101204

[责任编辑 吕冬梅]