

# 影响 MS 培养基凝固效果的几个因素的研究

陈云凤, 黎世龄\*, 李晓婷 (宜春学院生命科学与资源环境学院, 江西宜春 336000)

**摘要** [目的] 探讨 MS 培养基不好凝固的原因。[方法] 通过分析琼脂浓度、培养基 pH 值、灭菌时间及温度、碳源、活性炭、晃动培养基对 MS 培养基凝固效果的影响, 研究影响 MS 培养基凝固效果的因素。[结果] MS 培养基的凝固效果主要是受琼脂浓度和培养基 pH 值影响。在琼脂浓度低于 0.6% 或培养基 pH 低于 5.50 时培养基均不能很好地凝固。碳源、灭菌时间、灭菌温度、活性炭、晃动培养基等因素均能不同程度地影响培养基的凝固效果, 主要是因为它们在灭菌过程中改变了培养基 pH 值效应。灭菌温度达 130℃ 以上或灭菌时间超过 25 min 时均显著降低了培养基的凝固效果。[结论] 培养基的 pH 值和琼脂的浓度是影响 MS 培养基凝固效果的 2 个主导因素。

**关键词** MS 培养基; 凝固效果; pH 值; 琼脂

中图分类号 Q943.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)04-01338-02

## Study on Factors Affecting the Solidification of MS Medium

CHEN Yun-feng et al (College of Life Science and Resource Environment, Yichun University, Yichun, Jiangxi 336000)

**Abstract** The research aimed to discuss the reason of bad solidification of MS medium. The effects of agar concentration, pH value of medium, sterilization time, sterilization temperature, active carbon, shaking medium on solidification of MS medium were analyzed to study the factors affecting solidification of MS medium. The solidification of MS medium was affected by the agar concentration and pH value of medium. When the agar concentration was less than 0.6% or the pH value of medium was less than 5.50 the MS medium would not be well solidified. The carbon resources, sterilization time, sterilization temperature and shaking medium all had some effect on solidification of MS medium, resulting that they changed pH of medium during the sterilization course. When the sterilization temperature was more than 130℃ or the sterilization time was longer than 25 min the solidification effect of MS medium was decreased significantly. Both of pH value and agar concentration in MS medium were two leading factors to influence the solidification of MS medium.

**Key words** MS medium; Solidification effect; pH value; Agar

在植物组织培养过程中, 一般用琼脂作固化剂使培养基凝胶化, 其凝固效果直接关系培养材料的生长或生存。

目前已有不少关于培养基高温高压灭菌后 pH 值变化的研究<sup>[1-3]</sup>; 但对于影响培养基凝固效果的具体因素研究极少。笔者以 MS 培养基为对象, 探讨影响其凝固效果的多方面因素, 以利于组培材料的生长。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料与药品** MS 培养基<sup>[4]</sup>; 琼脂条(海洋食品有限公司制); 琼脂粉(日本进口, 上海化学试剂); 碳源: 蔗糖、果糖、食用白糖、葡萄糖; 活性炭。

**1.2 方法** 将母液兑成完全 MS 培养基, 用稀 HCl 或稀 NaOH 调节培养基的 pH 值至所需水平, 在每个容量为 50 ml 的三角瓶中统一装入 30 ml 培养基。在不进行其相关因素实验时, 培养基中都是添加了 3% 蔗糖和 0.8% 的琼脂粉, 分装前 pH 值调至 5.8, 118~120℃ 灭菌 20 min。pH 计型号“pHS-3C”型酸度计, 采用全量程复合玻璃电极, 可精确设置被测溶液的温度, 实现温度补偿, 读数准确, 方便快捷。3 次重复, 灭菌后培养基置于 25℃ 室内 1 h 后观察, 采取多次观察分析, 用平均值进行结果统计。

## 2 结果与分析

### 2.1 琼脂浓度和培养基 pH 值对培养基凝固效果的影响

**2.1.1 琼脂的浓度对 MS 培养基凝固效果的影响。** 表 1 显示, 琼脂作为固化剂对培养基的凝固有直接影响, 浓度的高低直接关系到培养基的凝固效果, 培养基的凝固效果与琼脂用量呈正相关。一般情况下, 琼脂浓度低于 0.6%, 培养基就不能很好地凝固, 当浓度达 0.8% 一般就能满足实验要求。

琼脂在培养基中仅作为固化剂, 但其中含有多种杂质成分, 可能对培养基成分会有一定的影响, 在用量上应加以考虑。日本进口的琼脂粉比琼脂条的凝固效果稍好, 主要是因为琼脂条的杂质多, 琼脂粉的有效成分相对高一些。这与陈永勤<sup>[5]</sup>的研究结果相反。

表 1 琼脂浓度和培养基 pH 值对培养基凝固效果的影响

Table 1 Effect of agar concentration and pH value of medium on solidification effect of medium

琼脂浓度 g/L	培养基 pH										
	pH value of medium										
Agar concentration	4.00	4.50	5.00	5.50	6.00	6.50	7.00	7.50	8.00	8.50	9.00
5	A(a)	A(a)	A(a)	B(a)	B(b)	C(b)	C(b)	C(c)	C(c)	C(c)	C(c)
6	A(a)	A(a)	A(a)	B(b)	B(b)	C(c)	D(c)	D(d)	D(d)	D(d)	D(d)
7	A(a)	A(a)	B(a)	B(b)	C(c)	D(d)	D(d)	D(d)	E(d)	E(e)	E(e)
8	A(a)	A(a)	B(b)	C(c)	D(d)	D(d)	E(d)	F(e)	F(f)	F(f)	F(f)
9	A(a)	B(a)	C(c)	C(c)	E(d)	F(e)	F(e)	F(f)	F(f)	F(f)	F(f)
10	A(a)	B(b)	C(b)	C(c)	E(d)	F(e)	F(f)	F(f)	F(f)	F(f)	F(f)
11	B(a)	B(b)	C(c)	D(c)	E(e)	F(f)	F(f)	F(f)	F(f)	F(f)	F(f)

注: 大、小写字母分别表示进口琼脂粉和国产琼脂条。A 或(a), 凝固很差、完全液体状态; B 或(b), 凝固差、稀糊状; C 或(c), 凝固一般、轻晃动时会滑动; D 或(d), 凝固较好、不太滑动; E 或(e), 凝固好、不滑动; F 或(f), 凝固很好、很硬、培养基上有一层水。下表同。

Note: Capital letters and lowercase letters mean imported agar powder and agar strip made in China. A or(a), poor solidation awfully, entire liquid; B or(b), solidation poor, dilute paste; C or(c), common solidation, slippage when shaken gently; D or(d), preferable solidation, hardly slippage; E or(e), good solidation, never slippage; F or(f), good solidation, very hard, and some water on medium. The same as below.

**2.1.2 pH 值对 MS 培养基凝固效果的影响。** MS 培养基的凝固与 pH 值呈正相关。当 pH 值低于 5.50 时, 培养基一般不能很好地凝固, 随 pH 值的提高, 培养基的凝固效果明显改善。植物组织在一定 pH 值下才能正常生长, 因此在配制时考虑培养基凝固情况的同时, 也要注意 pH 值的大小。

基金项目 江西省宜春市科技局重点项目。

作者简介 陈云凤(1982-), 女, 江西九江人, 在读硕士, 助教, 从事植物遗传育种的教研工作。\* 通讯作者, E-mail: lsh0303@163.com。

收稿日期 2007-09-30

**2.1.3 琼脂的用量与培养基 pH 值的互补作用。** 试验表明,当琼脂浓度过小时,可通过提高培养基的 pH 值来改善凝固效果;当 pH 值低时也可以通过增加琼脂的浓度来改善凝固效果,这与陈永勤<sup>[5]</sup>的研究相一致。

**2.2 碳源对 MS 培养基凝固效果的影响** 在培养基中一般要加入一定量的碳源,碳源有降低培养基灭菌后凝固效果的效应。表2 显示,碳源添加后,灭菌后培养基的凝固效果明显降低,降低程度与所添加的碳源量呈正相关;不同碳源培养基的下降程度有差异:添加3%蔗糖、2%食用白糖、1%葡萄糖或1%果糖时就能明显降低培养基灭菌后的凝固效果。相同条件下,果糖与葡萄糖的影响较大,能显著降低培养基的凝固效果,下降程度是果糖>葡萄糖>食用白糖>蔗糖。

添加一定量的碳源促进了培养基灭菌过程中 pH 值的下降。Ball<sup>[6]</sup>认为在高温灭菌时,培养基中蔗糖会水解成果糖和葡萄糖,而葡萄糖进一步变成葡萄糖酸,从而导致培养基 pH 值的下降。碳源在灭菌过程中水解,形成酸性物质,使培养基 pH 值下降,从而凝固效果降低。添加果糖、葡萄糖影响明显,由于高温灭菌后,果糖培养基的 pH 值比葡萄糖的下降幅度大得多,更易形成酸性物质。

表2 碳源对 MS 培养基凝固效果的影响

Table 2 Effect of carbon source on solidification effect of MS medium

碳源种类 Carbon sources	碳源浓度 % Carbon sources concentration					
	0	1	2	3	4	5
蔗糖 Sucrose	E <sup>+</sup>	E	E <sup>-</sup>	D <sup>+</sup>	C <sup>+</sup>	C
食用白糖 Edible white sugar	E <sup>+</sup>	E <sup>-</sup>	D <sup>+</sup>	D	C	C <sup>-</sup>
葡萄糖 Glucose	E <sup>+</sup>	D	D	C <sup>+</sup>	C	C <sup>-</sup>
果糖 Fructose	E <sup>+</sup>	D <sup>-</sup>	C	C	B	B

注:“+”表示凝固效果略高于标记水平;“-”表示凝固效果略低于标记水平。表4 同。

Note: “+” means solidification effect was better than marked level; “-” means solidification effect was worse than marked level. The same as table 4.

**2.3 灭菌时间及灭菌温度对 MS 培养基凝固效果的影响**

由表3 可知,经高温高压灭菌后培养基的凝固效果呈下降趋势,灭菌时间和灭菌温度均不同程度地影响 MS 培养基的凝固效果。130℃ 以下灭菌12、15、18、20 min 后培养基的凝固效果稍有降低,各个处理表现基本一致,无明显差异;但当灭菌时间达25 min 以上或灭菌温度达130℃ 时,培养基的凝固效果呈急剧下降,使原凝固很好的培养基凝固不好或根本不能凝固。这可能是在高温或长时间高压下,琼脂的有效成分结构被破坏,凝固能力减弱;同时培养基一些营养物质在高温下水解成酸性物质,造成培养基 pH 值下降。常规高温高压灭菌温度118~125℃,灭菌时间15~20 min,培养基的凝固会有所下降,主要是因为培养基在经高压灭菌后 pH 值下降了,pH 下降的原因可能是高温灭菌时 EDTA 铁盐和其他微量元素发生了相互作用。

**2.4 添加活性炭对 MS 培养基凝固效果的影响** 在植物组织培养中为了吸附植物的有害分泌物或防止组织褐变等,在培养基中通常加入一定量的活性炭。表4 显示,在高压灭菌后培养基的凝固程度明显下降,但灭菌前加入活性炭的培养基凝固程度会急剧降低,能降低一到两个凝固级别;活性炭

的含量不同,降低的程度略有差异,但差异不大。

表3 不同高温下灭菌不同时间对 MS 培养基凝固效果的影响

Table 3 Effect of different sterilization time under different high temperature on solidification effect of MS medium

灭菌温度 Sterilization temperature	灭菌时间 min Sterilization time						
	0	12	15	18	20	25	30
115~120	E	D	D	D	D	C	C
120~125	E	D	D	D	D	C	C
125~130	E	D	D	D	C	C	B
130~135	E	C	C	B	B	B	A

活性炭具有很强的吸附能力,有削弱琼脂凝固能力的作用。在配制培养基时要增加琼脂的量或提高 pH 值来改善培养基在灭菌后的凝固状况。

表4 不同浓度活性炭对 MS 培养基凝固效果的影响

Table 4 Effect of different active carbon concentration on solidification effect of MS medium

活性炭浓度 g/L Active carbon concentration	灭菌前各培养基凝固程度 Solidification extent of each medium before sterilization					
	A	B	C	D	E	F
0	A <sup>-</sup>	B <sup>-</sup>	C <sup>-</sup>	D <sup>-</sup>	E <sup>-</sup>	F <sup>-</sup>
1	A <sup>-</sup>	A	B <sup>-</sup>	C	D	E
2	A <sup>-</sup>	A <sup>-</sup>	B <sup>-</sup>	C <sup>-</sup>	D	E
3	A <sup>-</sup>	A	B	C <sup>-</sup>	D <sup>-</sup>	E
4	A <sup>-</sup>	A <sup>-</sup>	B <sup>-</sup>	B	C	E <sup>-</sup>

**2.5 晃动培养基对凝固效果的影响** 在培养基冷却凝固过程中,晃动培养基也对培养基的凝固效果有较大影响,影响程度与晃动剧烈程度呈正相关,对 B(b)、C(c)、D(d)、E(e) 状态的培养基影响十分显著,使凝固不好的培养基不能凝固,凝固好的不能很好地凝固。但对于不能凝固的和很硬的培养基影响不大(表5)。这在 NB、B5 等培养基凝固反应上是一致的。在实验中经常用到的是 D(d)、E(e) 两种凝固状态,因此晃动培养基对凝固效果也有一定影响。晃动培养基主要是破坏了琼脂的结构。

表5 晃动培养基对培养基凝固效果的影响

Table 5 Effect of shaking medium on solidification effect of MS medium

对照 Control	晃动级别 Shaking extent				
A	A	A	A	A	A
B	B	B	A	A	A
C	C	B	B	B	B
D	C	C	C	C	B
E	E	E	E	D	D
F	F	F	F	F	F

注: . 轻轻摇晃2 圈; . 在 . 的基础上稍加大力度,摇晃4 圈; . 摇6 圈; . 摇晃8~10 圈; . 剧烈晃动培养基。

Note I. Shaked 2 circles gently; II. Intensified strength based on I, shaked 4 circles; III. Shaked 6 circles; IV. Shaked 8-10 circles; V. Shaked violently.

### 3 小结与讨论

通过分析琼脂的浓度、培养基的 pH、灭菌时间及灭菌温度、碳源、活性炭、晃动培养基对 MS 培养基凝固效果的影响,

(下转第1374 页)

亮度约为18S的2倍,并且没有发现DNA污染,其不同波长下的吸光度比值为 $OD_{260}/OD_{280} = 1.95$ 、 $OD_{260}/OD_{230} = 2.47$ 。这表明RNA质量较好。从图1B可以看出该法所提DNA完整性好、纯度高,基本上没有蛋白质和RNA污染, $OD_{260}/OD_{280} = 1.92$ ,这表明DNA可以用于之后的试验。

**2.2 刺梨 Actin 基因的PCR扩增** 取约1  $\mu$ g 总RNA进行RT-PCR反应,扩增产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测,在约300 bp处获得与预期一致的特异条带(图1 C1),初步确定其为Actin的基因部分序列,而以基因组DNA为模板进行PCR反应未在约300 bp处扩增出特异条带(图1 C2),说明Actin基因跨内含子,用该Actin基因片段作内标可减少DNA污染。

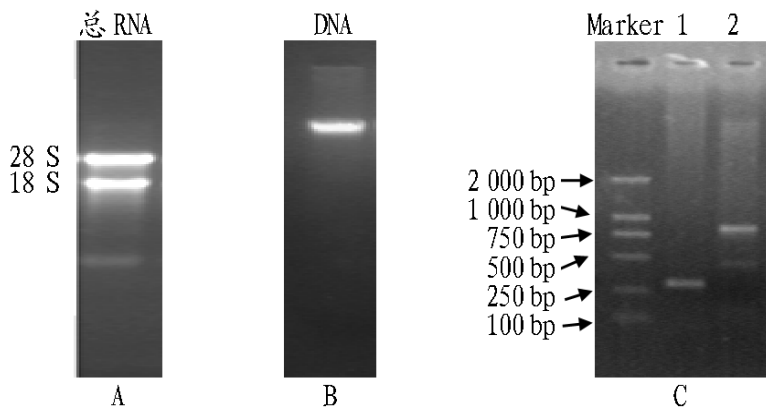


图1 刺梨果实总RNA(A),基因组DNA(B)和Actin基因的RT-PCR扩增(C1)和PCR扩增(C2)

Fig. 1 Total RNA(A), genomic DNA(B), PCR(C1) and RT-PCR(C2) amplification of Actin gene from *Rosa roxburghii* Tratt

**2.3 扩增产物测序结果及分析** 将目的片段回收后克隆于T载体并测序,获得Actin基因的298 bp序列,图2、3为其碱基序列及其推导的氨基酸序列。核苷酸序列同源性分析表明,克隆所得序列与蔷薇(*Rosa hybrid cultivar*)、桃(*Prunus persica*)和葡萄(*Vitis vinifera*)的碱基序列相似性较高,达83%,与富士苹果(*Malus × domestica*)、甜菜(*Beta vulgaris*)等的相似性均在80%以上。由该核苷酸序列推导的氨基酸序列比对结果显示,刺梨Actin基因的氨基酸序列与梨(*Pyrus communis*)的相似性高达97%,其次是和葡萄的相似性达97%和96%,而与花生(*Arachis hypogaea*)、大豆(*Glycine max*)、棉花(*Gossypium hirsutum*)和马铃薯(*Solanum tuberosum*)的相似性为96%,与水稻(*Oryza sativa*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)等的相似性也在90%以上。

(上接第1339页)

表明MS培养基的凝固效果主要是受琼脂浓度和培养基的pH值影响;高温高压灭菌后培养基凝固不好,主要是因为培养基的pH值下降了,灭菌时间、灭菌温度、碳源、活性炭等因素影响MS培养基的凝固,主要是因为它们在灭菌的过程中有改变培养基pH值的效应。在其他培养基如NB、B5、White等培养基效果也同样主要受这两方面因素的影响;相同情况下,培养基之间的凝固效果不同,主要是因为高压灭菌过程中影响因素的影响效应有所差异。

在植物组织培养过程中,培养基的pH值是由培养的植物材料不同而决定,但培养过程对培养基的凝固效果的要求并不因pH值而变,所以对某种特定培养对象,即要考虑

CAGTGGTCGTACAACCTGGTATTGTGCTTGACTCTGGTGTGTCAGCCATACAGTCC  
CCATATACGAGGGATATGCCCTTCCTCATGCCATCCTTCGTCTTGACCTGCTGGTCCGTGA  
CCTCACTGATAGCTTGATGAAAAATTCTTACCGAGCGTGGATATTCTTTCCTACTACCACTGCA  
GAGCGTGAATTTAGGGACATGAAGAAAACTTGCTTACATTGCCCTTGACTATGAGC  
AGGAGCTGGAGACATCCAAAACCAGCTCCTCAGTTGAGAAGAGCTATGAGCTACCT

图2 扩增片段测序序列

Fig. 2 Speculation sequence from amplified fragment

SGRTTGI VLDSDGCVSHTVPIYEGYALPHA I LRLDLAGRD L TDSLMLK I LTERGYSFTTT  
AEREIVRDMKEKLAYIALDYEQELETSKTS SSVKSYELP

图3 扩增片段编码氨基酸

Fig. 3 Amino acid sequence coded by amplified fragment

### 3 讨论

该研究提取的刺梨总RNA无明显降解,质量较好,可用于RT-PCR反应和基因克隆;该方法便于操作、简单易行,适合于刺梨这种富含多糖、多酚等物质的果树组织RNA提取,同时还为其他植物总RNA的提取提供一种参考方法。

刺梨Actin序列与蔷薇和桃等核苷酸序列的同源性为83%,而与多种植物的氨基酸序列的同源性高于90%。理论上,一个理想的内标应该在各种不同的细胞类型、不同发育阶段、采用不同处理方法时都能稳定表达,一个稳定的内标是确定目标基因相对表达量的基础<sup>[6]</sup>。以往研究表明,Actin基因在生物体内主要参与细胞结构、细胞内运动、细胞分裂等细胞生理过程。因此,Actin基因表达量在时间、空间上都较稳定。该研究克隆的刺梨Actin基因cDNA片段,可为将来深入研究该基因奠定基础,更重要的是,该cDNA片段在刺梨基因组中含有内含子,因此可作为该类植物基因表达研究中的理想内标。

### 参考文献

- [1] 陈颖,王刚,赵俊霞.高等植物体内的肌动蛋白[J].生物学通报,2003,38(1):13-15.
- [2] THELLINO,ZORZI W,LAKAYE B,et al. Housekeeping genes as internal standards: Use and limits[J]. Journal of Biotechnology,1999,75:291-295.
- [3] CLÉMENT THOMAS, DENSE MEYER, MICHEL WOLFF, et al. Molecular characterization and spatial expression of the sunflower ABP1 gene[J]. Plant Molecular Biology,2003,52:1025-1036.
- [4] XIA LAI-XIN, CHENG HAN HUA, GUO YI-QING, et al. Characterization of the  $\alpha$ -actin gene of the rice field Eel and its phylogeny in fish [J]. Acta Genetica Sinica,2005,32(7):689-695.
- [5] 安华明.刺梨高含量AsA的积累机制及其关键酶基因的克隆与表达[D].杭州:浙江大学,2005:51-53.
- [6] SUZUKI T, HIGGINS PJ, CRAWFORD DR. Control selection for RNA quantitation[J]. Biotechniques,2000,29:332-337.

培养对象所要求的pH值,又要通过调整某些因素保证培养基具有一定的凝固程度。

### 参考文献

- [1] TORRES K C. Plant tissue culture for horticultural crops[M]. New York: Van Nostrand Reinhold,1989:141-142.
- [2] HERIK R L M. In vitro culture of higher plants[M]. The Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers,1987:278-279.
- [3] 汪良驹,刘友良,马凯,等.高温高压灭菌对MS培养基pH的影响[J].植物生理学通讯,1997,33(1):10-14.
- [4] 李浚明.植物组织培养教程[M].北京:中国农业出版社,2002:24.
- [5] 陈永勤.MS培养基凝固效果和高温灭菌后pH值变化的研究[J].湖北大学学报,2001,23(3):280-283.
- [6] BALL E. Hydrolysis of sucrose by autolysing media-a neglected aspect in the technique of culture of plant tissues[J]. Bull. Torrey Bot. Club,1953,80:409-411.