



全国高等农林院校“十一五”规划教材

园艺植物

生物技术实验指导

胡桂兵 主编



 中国农业出版社

全国高等农林院校“十一五”规划教材

园艺植物生物技术 实验指导

胡桂兵 主编

中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

园艺植物生物技术实验指导/胡桂兵主编. —北京: 中国农业出版社, 2010. 2

全国高等农林院校“十一五”规划教材

ISBN 978 - 7 - 109 - 14319 - 7

I. 园… II. 胡… III. 园林植物—生物技术—实验—高等学校—教材 IV. S680.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 002960 号

北京三木印刷有限公司印刷 新华书店北京发行所发行
2010 年 3 月第 1 版 2010 年 3 月北京第 1 次印刷

开本: 720mm×960mm 1/16 印张: 10

字数: 176 千字

定价: 14.50 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

主 编 胡桂兵

副主编 徐昌杰 郭文武 程玉瑾

编 者 (按姓氏笔画排序)

邓群仙 (四川农业大学)

杨向晖 (华南农业大学)

胡桂兵 (华南农业大学)

姜 玲 (华中农业大学)

秦永华 (华南农业大学)

徐昌杰 (浙江大学)

郭文武 (华中农业大学)

程玉瑾 (华南农业大学)

程运江 (华中农业大学)

霍秀文 (内蒙古农业大学)

审 稿 林顺权 (华南农业大学)

刘成明 (华南农业大学)

何业华 (华南农业大学)

前 言

《园艺植物生物技术实验指导》作为《园艺植物生物技术》的配套教材，是为了适应调整后的园艺专业及园艺生物技术方向的培养要求而编写的。园艺植物生物技术实验是学好和掌握园艺植物生物技术的基本原理、基本知识和基本操作技能的重要环节。改革和加强实验教学，对培养学生动手能力和创新精神至关重要。

全书分为细胞工程、基因工程和 DNA 分子标记三个部分，包括 39 个园艺植物生物技术基本实验。各个实验除了介绍实验目的和原理、试材及器具、实验步骤、思考题与作业之外，作者还结合自己的实践经验，增设了操作提示的内容，目的是使初学者尽快掌握园艺植物生物技术的实验操作技术。

由于时间仓促和水平所限，书中难免有纰漏和欠妥之处，请各位读者不吝赐教。

编 者

2009 年 10 月

目 录

前言

第一部分 细胞工程	1
实验 1-1 培养基母液的配制	1
实验 1-2 培养基的配制与灭菌	6
实验 1-3 植物材料的消毒与接种	11
实验 1-4 愈伤组织诱导及悬浮细胞培养	16
实验 1-5 植物茎尖脱毒与病毒检测	18
实验 1-6 胚状体诱导技术	23
实验 1-7 花药培养及花粉发育时期的鉴定	24
实验 1-8 胚挽救技术	27
实验 1-9 原生质体的分离与纯化	28
实验 1-10 原生质体培养	32
实验 1-11 原生质体融合	36
实验 1-12 植物离体培养诱导开花	38
实验 1-13 兰花原球茎快繁技术	41
实验 1-14 香蕉快繁技术	45
实验 1-15 离体种质保存	48
第二部分 基因工程	53
实验 2-1 基因组 DNA 提取	53
实验 2-2 RNA 提取与逆转录	56
实验 2-3 核酸琼脂糖凝胶电泳	61
实验 2-4 核酸定量	63
实验 2-5 PCR	66
实验 2-6 DNA 连接、感受态细胞制备与转化	68
实验 2-7 质粒提取与重组质粒的酶切鉴定	71
实验 2-8 重组质粒的 PCR 鉴定	74

实验 2-9 愈伤组织或悬浮细胞与根癌农杆菌共培养转化	76
实验 2-10 茎段与根癌农杆菌共培养转化	79
实验 2-11 叶盘与农杆菌共培养转化	81
实验 2-12 原生质体 PEG 介导转化	83
实验 2-13 发根农杆菌介导的目的基因转化	89
实验 2-14 基因枪转化外源基因	91
实验 2-15 GUS 或 GFP 检测	93
实验 2-16 RT-PCR 技术	98
实验 2-17 Southern 杂交	100
实验 2-18 Northern 杂交	105
实验 2-19 Western 杂交	110
第三部分 DNA 分子标记	119
实验 3-1 RAPD 分子标记	119
实验 3-2 AFLP 分子标记	122
实验 3-3 SSR 分子标记	129
实验 3-4 ISSR 分子标记	134
实验 3-5 SRAP 分子标记	137
附录	141
附录 1 常用基本培养基配方	141
附录 2 DNA Markers	149
附录 3 33 μ g/ml 引物配成 10 μ mol/L 应加双蒸水的体积 (μ l)	150
附录 4 常用抗生素的配制与使用	150
附录 5 同位素操作注意事项	150
主要参考文献	152

第一部分 细胞工程

实验 1-1 培养基母液的配制

一、实验目的和原理

园艺植物生物技术相关研究中，配制培养基是常规工作。为简便起见，将培养基配方中的药品按一定浓缩倍数一次称量供一段时间使用，即配制成浓溶液，使用时按相应倍数稀释，这种浓溶液称为贮备液或母液（stock solution）。制备培养基母液具有以下优点：一是避免多次称量的误差；二是便于培养基中微量元素等浓度低的药品的称量；三是保证外植体每次培养所用培养基具有相同的元素含量；四是便于低温冷藏。

培养基母液包括两种类型：一种是基本培养基的贮备液或母液，另一种是植物生长调节剂或植物激素的贮备液。

母液的配制方法有两种：一种是配制成单一化合物的母液，另一种是配制成几种不同化合物的混合液。前者适用于配制多种培养基都需要同一种溶液，后者适用于大量配制同种培养基。植物生长调节剂通常单独配制母液。

一般基本培养基的母液配成大量元素、铁盐、微量元素、有机成分等母液，其中有机成分中的维生素、氨基酸类可以分别配制，也可以混在一起。大量元素的母液配制时药品浓度是培养基的使用浓度的 10~100 倍，以 20 倍为佳；微量元素、有机成分等母液配制时药品的浓度是使用浓度的 100~1 000 倍。植物生长调节剂或植物激素的母液浓度，可根据需要配制成 0.1mg/ml、0.5mg/ml 或 1.0mg/ml。

本实验的目的是掌握配制和保存培养基母液的基本技能。

二、试材及器具

1. 试剂 配制 MS 培养基所需的化学药品（本实验基本培养基以 MS 培养基为例）、植物生长调节剂（NAA、IBA、2,4-D、BA 或 KT）、95% 的酒精、1.0mol/L NaOH、1.0mol/L HCl、蒸馏水。化学药品的纯度尽量选用分

析纯 (AR), 如条件不许可, 也可选用化学纯 (CP) 的药品。

2. 仪器及用具 烘箱、电子天平 (精度为 0.01g 或 0.001g、0.000 1g)、电炉或微波炉、烧杯 (100ml、300ml)、容量瓶 (500ml、1 000ml)、玻棒、玻璃瓶 (100ml 或 200ml、500ml)、吸管、标签、冰箱等。

三、实验步骤

(一) 母液 I (MS 的大量元素, 20 倍的浓溶液, 配制母液总体积 1 000ml)

1. 计算 根据 MS 基本培养基配方, 按下列公式计算大量元素各药品应称取的质量。

$$m=c \times V \times A \times 0.001$$

式中, m 为 MS 基本培养基中某大量元素药品实际称取的质量 (g); c 为 MS 基本培养基配方中该药品的使用浓度 (mg/L); V 为配制 MS 大量元素母液的体积 (L); A 为配制 MS 大量元素母液的浓溶液倍数。

【操作提示: 实际应用中氯化钙有 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 CaCl_2 两种存在形式, 而 MS 基本培养基提供的是 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的使用浓度。如果选用 CaCl_2 , 在计算药品称取的质量时应扣除其中的结晶水含量。】

2. 称量 用精度 0.01g 或 0.001g 天平称取下列药品, 分别放入 100ml 或 300ml 烧杯中。

NH_4NO_3	33.0g
KNO_3	38.0g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7.4g
KH_2PO_4	3.4g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	8.8g (或 CaCl_2 6.64g)

【操作提示: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 或 CaCl_2 在空气中极易潮解, KNO_3 微潮解, 称量时动作要迅速。】

3. 溶解和定容 用适量蒸馏水分别将药品充分溶解, 然后将溶液依次转入 1 000ml 容量瓶中混合, 并用蒸馏水润洗烧杯多次, 同时将润洗液一并转入容量瓶中。加蒸馏水将容量瓶中液体定容至 1 000ml, 摇匀即配制成 MS 大量元素 20 倍浓缩母液。

【操作提示: ①因 Ca^{2+} 和 SO_4^{2-} , Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 PO_4^{3-} 一起溶解后会产生沉淀, 影响培养效果。因此, 配制时各种药品先以少量水使其充分溶解, 然后再把已溶解好的各种溶液按一定的次序缓慢混合, 力求将易产生沉淀的离子错开。②如果配制大量元素母液的浓缩倍数较大, 为避免混合后产生沉淀, 也可

将 CaCl_2 单独溶解、定容和装瓶。】

4. 装瓶 将配制好的母液倒入 2 个 500ml 或 1 个 1 000ml 干净的玻璃瓶中。

【操作提示：装瓶后应立即贴好标签，注明基本培养基名称、母液号、浓溶液倍数和配制日期。】

(二) 母液 II (MS 的铁盐, 100 倍浓溶液, 配制总体积 500ml)

1. 计算 根据 MS 基本培养基配方, 按下列公式计算配制铁盐所需药品称取的质量。

$$m=c \times V \times A \times 0.001$$

【操作提示：实际应用中，硫酸亚铁有 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (浅绿色) 和 FeSO_4 (白色) 等存在形式，而 MS 基本培养基中提供的是 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的使用浓度。如果选用 FeSO_4 ，在计算药品称取的质量时应扣除其中的结晶水含量。】

2. 称量 用精度 0.001g 或 0.000 1g 的天平称取下列药品，分别放入 300ml 烧杯中。

$\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 1.865g

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.390g

【操作提示： $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 在空气中遇热会逐渐风化失去一部分结晶水，同时亚铁盐容易被氧化。因此，浅绿色的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 在空气中风化的同时，表面易被氧化成黄褐色的 $\text{Fe}(\text{OH})\text{SO}_4$ 。实验中，应避免使用已被氧化的硫酸亚铁，同时称量时动作要迅速。】

3. 溶解和定容 分别溶解 $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 和 FeSO_4 ，然后将 FeSO_4 溶液缓缓倒入到 $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 的加热溶液中，边加边搅拌并继续加热 5min，使其充分整合，溶液冷却至室温后无棕红色胶状 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 沉淀析出，并且溶液呈浅绿色或黄绿色，即可转入 500ml 容量瓶，加水定容到 500ml，并调整 pH 至 5.5，摇匀即配制成 MS 铁盐 100 倍浓缩母液。

【操作提示：① Fe^{2+} 为植物材料吸收的有效形态，但极易被氧化，为保证铁素的稳定供应，培养基中常用 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和乙二胺四乙酸二钠 ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$) 配制成有机态螯合铁供植物吸收和利用。也可直接购买 Na-Fe-EDTA 。② Fe^{3+} 盐溶解后容易水解，而加热促进水解，如螯合铁溶液呈现黄棕色、棕色、深棕色甚至析出棕红色胶状 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 沉淀，表明 Fe^{2+} 已经部分被氧化为 Fe^{3+} 。③在酸性溶液中 Fe^{2+} 较稳定，在碱性溶液中立即被氧化，因此，在保存亚铁盐溶液时，应加入酸调整溶液的 pH 为酸性条件，防止水解。】

4. 装瓶 将配制好的母液倒入 500ml 干净的棕色玻璃瓶中，贴好标签。

【操作提示：铁盐贮备液必须贮存在琥珀色或棕色的玻璃瓶中。】

(三) 母液Ⅲ (MS 的微量元素, 200 倍浓溶液, 配制总体积 500ml)

1. 计算 根据 MS 基本培养基配方, 按下列公式计算微量元素各药品应称取的质量。

$$m=c \times V \times A$$

【操作提示: 实验室中 MnSO_4 、 CuSO_4 、 ZnSO_4 、 CoCl_2 、 Na_2MoO_4 等药品有不同分子的结晶水存在形式, 应根据具体情况准确计算各药品称取的质量。】

2. 称量 用精度 0.000 1g 或 0.000 01g 天平准确称取下列药品, 分别放入 100ml 烧杯中。

H_3BO_3	620mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2 230mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2.5mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	860mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.5 mg
KI	83mg

【操作提示: ①因无水 CoCl_2 (蓝色) 和无水 CuSO_4 (白色) 吸水性很强, 在空气中容易潮解变色, 因此, 称量这些药品时动作要迅速。②由于 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的用量极低, 称量时应选用精度为 0.000 01g 的天平, 小心、准确地称取; 也可将其单独配成一定浓度的母液, 在配制 MS 微量母液时, 准确吸取相应体积即可。】

3. 溶解和定容 各药品分别溶解, 再依次混合, 最后定容到 500ml, 摇匀即配制成 MS 微量元素 200 倍浓溶液母液。

【操作提示: ① H_3BO_3 在冷水中溶解度很小, 需加热溶解。②实验中也可将使用浓度相对较高的 H_3BO_3 、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 KI 按浓溶液 100 倍计算、称量, 分别溶解后混合在一起, 配制成微量元素 i; 而将使用浓度低的 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 按浓溶液 200 倍或 1 000 倍计算、称量, 分别溶解后混合在一起, 配制成微量元素 ii。】

4. 装瓶 将配制好的母液倒入 500ml 干净的玻璃瓶中, 并贴上标签。

(四) 母液Ⅳ (MS 的有机成分, 浓溶液 200 倍, 配制总体积 500ml)

1. 计算 根据 MS 基本培养基配方, 按下列公式计算有机成分各药品应称取的质量。

$$m=c \times V \times A \times 0.001$$

【操作提示: 因肌醇使用浓度较高, 实验中可将肌醇单独配制成 10 倍或

20 倍的贮备液，其他 4 种有机物质按 100 倍或 200 倍浓缩混合配制成贮备液。也可将 5 种有机物质混合配在一起。】

2. 称量 用精度 0.000 1g 的天平准确称取下列药品，分别放入 100ml 烧杯中。

肌醇	10g
甘氨酸	0.2g
盐酸吡哆醇（维生素 B ₆ ）	0.05g
盐酸硫胺素（维生素 B ₁ ）	0.01g
烟酸	0.05g

【操作提示：除肌醇外，其余 4 种有机物的使用浓度均较低，称量时应做到细心、准确。】

3. 溶解和定容 分别溶解，依次混合，最后加水定容到 500ml，摇匀即配制成 MS 有机成分 200 倍浓溶液母液。

【操作提示：也可将各有机物质分别溶解后，单独定容存放。】

4. 装瓶 将配制好的母液倒入 500ml 干净的玻璃瓶中，并贴好标签。

（五）植物生长物质母液的配制（配制浓度 0.5mg/ml，配制体积 100ml）

1. 计算 按下列公式计算各植物生长调节剂和植物激素母液配制时应称取的质量。

$$m=c \times V$$

式中， m 为某植物生长调节剂实际称取的质量（mg）； c 为该植物生长调节剂配制母液的浓度（mg/ml）； V 为配制母液的体积（ml）。

2. 称量 用精度 0.001g 或 0.000 1g 的天平准确称取下列药品，分别放入 100ml 烧杯中。

生长素类（如 IAA、IBA、NAA、2,4-D）	50mg
细胞分裂素类（6-BA、KT、ZT、2-ip、TDZ）	50mg
赤霉素类（GA ₃ 、GA ₄ ）	50mg

【操作提示：因植物生长调节剂均是在微量下对植物的器官分化和形态建成起调节作用，因此在计算和称量时一定要准确。】

3. 溶解和定容 将生长素类和赤霉素类先用少量 95% 的乙醇溶解，细胞分裂素类先用少量 1.0mol/L 的 HCl 或 1.0mol/L 的 NaOH 溶解，再分别加入 50ml 左右蒸馏水，如溶解不完全再加热助溶。最后将溶液转入 100ml 容量瓶中，并用蒸馏水润洗烧杯多次，同时将润洗液一并转入容量瓶中。加蒸馏水定容至 100ml，摇匀即配制成浓度为 0.5mg/ml 的母液。

4. 装瓶 将配制好的母液倒入 100ml 干净的棕色玻璃瓶中，贴好标签，

注明植物生长物质名称、配制浓度和配制日期。

【操作提示：IAA 易光氧化降解，因此必须用棕色玻璃瓶存放。】

(六) 母液的保存

将配制分装好的母液瓶储放在 4~8℃ 冰箱内备用。

【操作提示：①贮备母液尤其是有机成分和植物生长物质尽管存放于 4~8℃ 低温环境中，也并不能长期存放，否则易呈现悬浮物或受微生物污染而影响有效成分的浓度，所以配制好的培养基母液应尽可能快地使用完。②在使用这些母液之前必须摇动观察，如果发现其中有沉淀、悬浮物或微生物污染，就不能再使用。】

四、思考题与作业

1. 总结实验过程与结果，按规范格式写出实验报告。
2. 配制培养基前，为什么要先配制母液？
3. 植物生长物质的母液为什么要单独配制？
4. 配制母液时的注意事项有哪些？

(邓群仙编写)

实验 1-2 培养基的配制与灭菌

一、实验目的和原理

1. 培养基的配制 植物离体培养时，培养基提供其生存、代谢、生长、分化等各种生命活动所需的各种营养成分，但不同材料及不同培养阶段对培养基中各种营养成分的要求不同，适当地选用培养基种类并调整其含量，对植物离体培养取得成功至关重要。另外，对培养物的脱分化和再分化等状态的调控、次生代谢产物的生产等都要通过调节培养基成分来实现。

培养基按层次可分为基本培养基和完全培养基。其中，基本培养基的主要成分包括无机营养物、有机成分和碳源等；完全培养基是在基本培养基中加入植物生长物质（包括植物激素和植物生长调节剂），植物生长物质是培养基中的关键成分，对外植体器官的诱导、分化与生长起着重要的调节作用。

培养基按物理状态可分为液体培养基、半固体培养基和固体培养基，可根据实验目的、材料选择培养基类型。

配制培养基时应根据各贮备母液的浓溶液倍数或浓度，计算各母液应该量取的体积。

基本培养基各贮备母液量取体积的计算公式为：

$$V_1 = V_2 / A$$

式中， V_1 为某贮备母液应量取的体积 (ml)； A 为该贮备母液的浓溶液倍数； V_2 为配制培养基的体积 (ml)。

植物生长物质各贮备母液量取体积的计算公式为：

$$V_1 = c_2 \times V_2 / c_1$$

式中， V_1 为某植物生长物质贮备母液应量取的体积 (ml)； c_1 为该植物生长物质贮备母液的浓度 (mg/ml)； V_2 为配制培养基的体积 (L)； c_2 为培养基配方中该植物生长物质的使用浓度 (mg/L)。

培养基中其他添加物称量的计算公式为：

$$m = c \times V$$

式中， m 为某添加物应称取的质量 (mg)； c 为培养基配方中该物质的使用浓度 (mg/L)， V 为配制培养基的体积 (L)。

2. 培养基和无菌操作器具的灭菌 凡是暴露在空气中的物体，或曾经接触过自然水源的物体都是带菌的。植物离体培养所用的培养基含有植物细胞生长所必需的各类营养物质，也是各种细菌、真菌滋生繁殖的极好场所。因此，植物离体培养时必须采用无菌技术，而培养基和无菌操作器具是植物离体培养的两大污染来源，必须严格进行灭菌。

培养基灭菌常用高压蒸汽灭菌法（即湿热加压灭菌法），对于高温下易分解的物质如 IAA、ZT、GA 等应采用过滤灭菌法。如需过滤灭菌的药品，应在高压蒸汽灭菌后，培养基凝固之前加入，并轻摇使其混匀。为此，培养瓶中培养基的装入量和过滤灭菌后的物质都应事先计算好，定量加入其中。

本实验的目的是掌握制备培养基的基本技能。

二、试材及器具

1. 试剂 配制 MS 培养基的各种母液、植物生长物质母液、琼脂、蔗糖、蒸馏水、1.0mol/L HCl、1.0mol/L NaOH 等。

2. 仪器及用具 电子天平（精度为 0.01g）、压力蒸汽灭菌器、烘箱、电炉或微波炉、烧杯（500ml、1 000ml）、移液管（1ml、5ml）、量筒（50ml）、搪瓷量杯（1 000ml）、培养瓶（或试管）、三角瓶或玻璃瓶（250~500ml）、玻

棒、分液漏斗（或下口杯）、培养皿（或不锈钢盘碟）、镊子、手术剪、解剖刀刀柄、酸度计或 pH 试纸、牛皮纸（或报纸）、快速滤纸（或纱布）、标签、记号笔等。

3. 培养基配方 MS+NAA0.5mg/L+6-BA 2.0mg/L+蔗糖 30g/L+琼脂条 9.0g/L（琼脂粉 5.0g），pH5.8；配制体积 1 000ml。

【操作提示：琼脂的用量因季节或用的是琼脂粉还是琼脂条稍有差异，以能凝固、有一定的硬度但又不太硬为度。】

三、实验步骤

（一）培养基配制

1. 计算 根据前述公式，计算各贮备母液应量取的体积和其他添加物品应称取的质量。

母液Ⅰ（MS 大量元素，20 倍）50ml

母液Ⅱ（MS 铁盐，100 倍）10ml

母液Ⅲ（MS 微量元素，200 倍）5ml

母液Ⅳ（MS 有机物，200 倍）5ml

NAA（0.5mg/ml）1ml

6-BA（0.5mg/ml）4ml

琼脂条 9.0g（或琼脂粉 5.0g）

蔗糖 30g

【操作提示：①配制培养基前，应先将各贮备母液摇动观察，如果发现其中有沉淀、悬浮物或微生物污染，就不能再使用，应重新配制。②计算时，一定要仔细核对贮备母液瓶上标注的浓溶液倍数或浓度。】

2. 固化剂熔化 称取 9.0g 琼脂条（或 5.0g 琼脂粉）和 30.0g 蔗糖，放入搪瓷量杯（或 1 000ml 烧杯）中，加入 500ml 左右蒸馏水，放于电炉或微波炉加热溶解，并用玻棒不停搅拌直至琼脂完全熔化。

【操作提示：①为加快琼脂条熔化，可将其剪成小段放入水中加热熔化。②为避免琼脂在杯底熬糊或沸腾溢出，加热中途应用玻棒不停搅拌。】

3. 试剂量取 用专一的量筒（用于量取大量元素）和移液管依次、准确量取各种母液，加入到琼脂与蔗糖溶液中。

【操作提示：①量取母液前，应先将贮备母液按顺序摆放好，并将专用的移液管放在对应的母液瓶前。②为方便操作，常将量取的母液先放入盛有 200ml 左右蒸馏水的烧杯中，然后复核各母液是否已完全加入，同时观察母液

混合后是否发生沉淀或浑浊现象,如无遗漏、差错,再将烧杯中的母液倒入琼脂液中,用蒸馏水多次润洗烧杯,并将润洗液一并转入琼脂液中。】

4. 定容、调整 pH 将上述溶液用蒸馏水定容至 1 000ml,继续加热至 80℃左右,用酸度计或精密 pH 试纸先测定培养基的 pH,用 1.0mol/L NaOH 或 1.0mol/L HCl 调整培养基的 pH 为 5.8。

【操作提示:①培养基定容前一定要复核各物品是否已完全加入,无遗漏、差错,才定容。②由于配制好的培养基经过高压灭菌后常会使其 pH 降低 0.1~0.3,因此,配制培养基调整 pH 时,可根据需要上调 0.1~0.3。】

5. 分装 把熬制好的培养基倒入分液漏斗(或其他分装器),通过下口橡皮管上的弹簧止水夹控制,将培养基趁热分装入培养瓶(或试管)中。

【操作提示:①每个培养瓶(或试管)盛装培养基的体积一般占该容器总容量的 1/5~1/4 (100ml 的培养瓶装入 20~35ml 培养基,25mm×150mm 的试管装入 15~20ml 培养基)。②分装时不要将培养基黏附到瓶口、管口及其附近的内壁上,如不小心黏到可用干净的滤纸或棉球将其擦拭干净。③由于琼脂在 40℃即凝固,所以培养基分装完后应立即用热水刷洗漏斗和搪瓷量杯(或烧杯)。】

6. 加盖 分装好的培养基应立即加盖,在培养瓶或试管上标明培养基代号与配制时间。

【操作提示:①试管用棉塞塞上后,每 7 或 10 支试管捆成一扎,试管中上部可用牛皮纸包盖棉塞。②如装培养基的三角瓶使用封口膜,包扎的绳子应打活结。】

7. 其他物品准备 用牛皮纸或报纸分别包装好无菌操作时需用的各种器皿、器具及物品,用 250~500ml 的三角瓶(或玻璃瓶)盛适量蒸馏水,并用封口膜包好瓶口。

【操作提示:①为避免遗漏,物品包装前应先清理好无菌操作时所需用的各种器皿、器具及物品,包括培养皿、手术剪、镊子、解剖刀刀柄、带塞的广口玻璃瓶、滤纸、棉球等。②包装前可先把快速滤纸(或纱布)剪裁成培养皿大小,脱脂棉制成小棉球。③玻璃容器盛装蒸馏水的体积应不超过容器总容量的 2/3。】

8. 物品清理和洗涤 清理各种母液和物品,放回原位置保存;使用过的量筒、移液管、烧杯等用水洗涤干净,然后按次序放回原处;最后打扫实验室卫生。

【操作提示:清理母液时,检查各母液余下的容量是否充足,若发现某一母液容量不足下次实验所用,应做好记录以便有空时配制或立即配制。】

(二) 培养基灭菌

1. 加水 在压力蒸汽灭菌器内加入适量的水, 水量一定要淹没电阻丝, 水位齐平底架。

【操作提示: ①培养基灭菌多采用高压蒸汽灭菌法, 本实验以内热手提式压力蒸汽灭菌器为例介绍操作步骤, 如为全自动高压灭菌器请参考其使用说明书。②灭菌器内水垢较多时, 应及时清洗。全自动高压灭菌器对水质要求较高, 常要求加入蒸馏水。③选用压力蒸汽灭菌器时, 为节约时间, 可在装锅前加水后提前加热, 提高锅内水温。】

2. 装锅 把分装好的培养基、包扎好的各种器皿、器具及物品以及装有蒸馏水的三角瓶(或玻璃瓶)放入压力蒸汽灭菌器内。

【操作提示: ①培养基中含有植物细胞生长所需的各种营养物质, 易受细菌和真菌污染并产生有毒物质, 因此, 培养基分装后应立即灭菌, 至少应该在24h之内完成灭菌工作。②注意灭菌器内放物品的体积不超过总容量的2/3。③如提前开通电源预热灭菌器, 装锅时应断电。】

3. 加盖 盖上压力蒸汽灭菌器的盖, 上紧螺帽, 关上安全阀, 开通电源加热。

【操作提示: ①检查需要灭菌的物品无遗漏后再加盖。②注意对角拧紧螺帽。】

4. 灭菌 先关闭放气阀, 待灭菌器内压力升至0.05MPa时, 打开放气阀排除锅内冷空气, 当压力降到0时再关闭放气阀, 如此反复3次直至完全把锅内冷空气排除。此后压力表指针逐渐上升, 当压力达到0.11MPa、锅内蒸汽温度为121℃时开始计算灭菌时间, 通过开、关电源将压力控制在0.11~0.15MPa(对应水蒸气温度为121~126℃)维持15~25min。灭菌时间到后切断电源, 待锅内压力降为0时, 打开放气阀排除锅内剩余气体, 等到稍微冷却时打开锅盖, 使湿热蒸汽趁热散去, 待培养基没有凝固而又不烫手时取出培养基。

【操作提示: ①高压蒸汽灭菌时, 一定要将锅内空气排尽, 使压力和温度的关系相对应, 保证锅内物体升温均匀, 灭菌彻底。排冷空气也可采用另一种方法, 即先打开放气阀, 待锅内蒸汽大量喷出时维持10min再关闭。②使用高压灭菌器时操作人员不能离开, 即使使用全自动高压灭菌器也不能离人, 应随时观察锅内压力、温度变化。③灭菌时间到后, 应断电使锅内压力自然下降, 切勿为急于取出培养基而打开放气阀排气, 否则锅内气压下降太快会引起减压沸腾, 导致灭菌器内各容器中的培养基、蒸馏水溢出, 造成浪费或污染, 甚至烫伤操作人员。④灭菌完成后, 锅内压力降为0时, 应及时开盖取出培