



国家级实验教学示范中心系列实验教材
全国高等院校生物实验教学“十三五”规划教材



附数字资源增值服务

生命科学综合设计 实验指南

唐朝晖◎主编



华中科技大学出版社

<http://www.hustp.com>



国家级实验教学示范中心系列实验教材
全国高等院校生物实验教学“十三五”规划教材

生命科学综合设计 实验指南

主 编 唐朝晖

副主编 吴元喜 卢群伟 蒋 涛

编 委 刘静宇 王江林 柯 铁 白 虹

林 刚 李端琢 高 蒙



华中科技大学出版社

<http://www.hustp.com>

中国·武汉

内 容 提 要

本书是全国高等院校生物实验教学“十三五”规划教材。

华中科技大学生命科学与技术学院实验教学中心自2003年成立以来,在注重本科生基础实验技能教学的同时,一直致力于综合实验项目的设计与教学,本书将十多年来积累的实验方案收集、整理,并结合近年来生物研究技术的最新进展,推陈出新,积集成册。本书内容由三十五个综合实验方案组成。

本书不仅可以作为高等院校生命科学类高年级本科生综合设计性实验的参考实验方案,还可以作为各校研究生实验教材,填补了这方面的教材空缺。

图书在版编目(CIP)数据

生命科学综合设计实验指南/唐朝晖主编. —武汉:华中科技大学出版社,2018.9
全国高等院校生物实验教学“十三五”规划教材
ISBN 978-7-5680-4218-5

I. ①生… II. ①唐… III. ①生命科学-实验-高等学校-教材 IV. ①Q1-0

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2018)第 205471 号

生命科学综合设计实验指南

Shengming Kexue Zonghe Sheji Shiyān Zhinan

唐朝晖 主编

策划编辑:罗 伟

责任编辑:孙基寿

封面设计:原色设计

责任校对:李 琴

责任监印:周治超

出版发行:华中科技大学出版社(中国·武汉)

电话:(027)81321913

武汉市东湖新技术开发区华工科技园

邮编:430223

录 排:华中科技大学惠友文印中心

印 刷:武汉市籍缘印刷厂

开 本:787mm×1092mm 1/16

印 张:16.25

字 数:386千字

版 次:2018年9月第1版第1次印刷

定 价:48.00元



本书若有印装质量问题,请向出版社营销中心调换
全国免费服务热线:400-6679-118 竭诚为您服务
版权所有 侵权必究

序言

XUYAN

实验教学是生物学教学的重要组成部分,在培养创新型、高素质、实践能力强的生命科学人才的过程中发挥着至关重要的作用。建立“以培养学生实践创新能力为核心”的实验教学体系,一直是华中科技大学生命科学与技术学院实验教学中心的建设目标。编写与之相适应的现代生命科学实验及实践研究指导教材,是培养生命科学创新人才的重要环节。

多年来,华中科技大学生命科学与技术学院实验教学中心在夯实经典实验教学的同时,不断将生命科学领域新的实验研究技术及科研成果经过重新设计引入本科实验,并运用开放式实验教学方法开展教学活动。科研成果转化为实验教学资源,不仅提高了实验教师的科研探索能力,更锻炼了他们的实践教学能力,而且培养了一大批实践创新能力强的优秀学生。为推广实验教学经验,让更多的师生受益,实验教学中心组织具有丰富实践教学经验的教师对本领域综合设计实验的内容、教学方法和教学管理的经验进行了认真思考和总结,终于编写成书,正式出版,甚感欣慰。

这本书的实验项目虽然只涉及生命科学实验体系的一部分,但是编者本着重视创新思维和实践能力的培养的原则,在实验内容选择和编写上突出综合设计、实践能力和学科交叉,集综合设计与实验研究于一体,在实验原理、步骤等环节提供了实验探索与设计的思路及分析方法,在一向易忽视的实验结果与讨论部分强调了实验报告需要提供的实验过程阶段性结果及分析条目。该教材的某些关键实验技术还采用了录像、动画等数字课程,这样的编写方式不仅方便读者快速明晰实验目标,抓住实验重点,掌握实验技术,还有助于启发与训练读者的创新思维,达到举一反三的效果,有助于培养学生的实践创新能力。

这本书可为拟学习相关实验技术和研究内容的所有读者提供帮助,也可从事生命科学本科生实验教学的教师提供有价值的参考。相信该书的出版能为我校乃至其他高等院校的本科实验教学起到很好的促进和示范作用。



2018年6月于喻园

网络增值服务使用说明

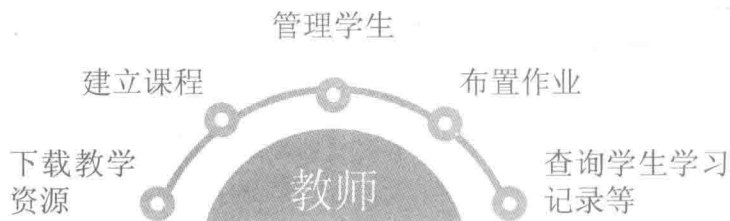
欢迎使用华中科技大学出版社教学资源服务网yixue.hustp.com

1. 教师使用流程

(1) 登录网址: <http://yixue.hustp.com> (注册时请选择教师用户)



(2) 审核通过后, 您可以在网站使用以下功能:



2. 学员使用流程

建议学员在PC端完成注册、登录、完善个人信息的操作。

(1) PC端学员操作步骤

① 登录网址: <http://yixue.hustp.com> (注册时请选择普通用户)

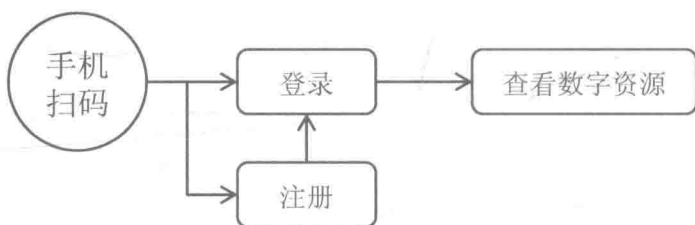


② 查看课程资源

如有学习码, 请在个人中心-学习码验证中先验证, 再进行操作。



(2) 手机端扫码操作步骤



前言

QIANYAN

华中科技大学生命科学与技术学院实验教学中心自 2003 年成立以来,在注重本科生基础实验技能教学的同时,一直致力于综合实验项目的设计与教学。经过十多年的努力,已经形成了一批适用于本科生学习的综合实验方案,包括反映经典生物学实验内容和体现学科前沿、学科交叉等特色的实验设计。这些实验方案在“生物科学大实验”、“生物技术大实验”、“生物物理大实验”等综合性实验教学课程的实际使用和应用中,激发了学生参与实验的积极性,提高了学生综合设计实验能力,为大批学生在省、国家、国际等各级生物学竞赛中取得优异的成绩奠定了很好的基础。

我们将十多年来积累的实验方案收集、整理,并结合近年来生物研究技术的最新进展,推陈出新,汇编成册。本书内容由三十五个综合实验方案组成。实验一至实验六以拟南芥、大肠杆菌、秀丽隐杆线虫、黑腹果蝇、斑马鱼、小鼠等常用模式生物的培养及观察技术为主,使学生能掌握规范的模式生物实验室培养及实验技术,为应用模式生物研究生命现象打下实验基础。实验七至实验十七以核酸、蛋白质等生物大分子的提取、纯化实验技术为主。实验方案根据各类分子不同的理化特性,采用离心分离、沉淀分离、吸附层析技术、凝胶层析技术、亲和层析技术等一种或多种分离纯化方法,将 DNA、RNA、蛋白质等生物大分子或花青素等生物活性小分子从菌液、动植物组织细胞、天然材料等生物材料中提取、纯化出来,并进行理化性质方面的检测、鉴定与研究。实验十八至实验三十五主要是以目前生物学功能、结构、材料等基础研究领域常用的先进实验技术为主,包括基因工程、免疫荧光、组织切片、遗传筛选、细胞工程、生物物理、生物材料等领域常规实验技术的规范操作及其在基础研究中的综合应用。

本书编写时,努力从学生自主完成实验任务的角度出发,在内容、结构上强调了以下几个方面。

(1) 每个实验方案都有明确的问题和应达到的具体要求,帮助学生明确实验目标,准确把握实验任务与方向。

(2) 既有实验原理,也有供学生参考的以流程图形式出现的实验设计方案,便于学生快速掌握解决问题的思路。

(3) 在实验操作步骤中,一些较复杂的基础实验技术或实验仪器的操作以图片、动画、视频等形式供学生实验时参考学习,另有一些易错、难做、危险等的操作细节也以文字的形式在相应的操作环节中加以提醒。

(4) 设计“实验结果与讨论”部分,帮助学生学会展示、呈现实验结果,厘清实验分析与讨论思路,学会有条理地针对实验过程及结果展开分析与讨论,并得出结论。



本书为开放式实验教学而设计、编写,旨在培养学生学会根据需要解决的问题,灵活运用实验技术进行实验设计,并通过合理规划实验过程,独立完成课题研究的能力。本书所有实验方案不能以常规的教学学时来衡量。

生命科学发展日新月异,实验教学的发展需要与时俱进。本书的实验方案只是抛砖引玉,读者在使用本书时可以围绕新的问题,重新进行实验设计,将相关的实验技术再次组合,形成新的实验方案以用于研究或教学。

本书不仅可以作为高等院校生命科学类高年级本科生综合设计性实验的参考实验方案,还可以作为各校研究生实验教材,填补了这方面的教材空缺。

感谢华中科技大学生命科学与技术学院的刘亚丰、谢青、肖靓、周爱文等老师在实验方案的教学与应用方面的辛苦工作,感谢常俊丽、陈明洁、汪盛、韩家鹏、刘飞、黄毓文、刘希良、吕月霞、徐旋等老师与同学在实验试做、图片采集等方面的辛苦工作。

由于时间仓促,水平有限,疏漏难免,诚恳希望广大读者提出宝贵建议和意见,以使本书能够更好地满足教师教学和学生学习的需要。

编 者

目录

MULU

实验一	大肠杆菌的培养及其生长曲线的测定	/1
实验二	拟南芥的培养与观察	/5
实验三	秀丽隐杆线虫的培养及观察	/9
实验四	黑腹果蝇的培养与观察	/15
实验五	斑马鱼的人工饲养及繁殖	/20
实验六	小鼠的饲养管理及基本实验操作	/25
实验七	质粒的大量提取纯化与分析	/34
实验八	人血液基因组 DNA 的提取、纯化与分析	/39
实验九	拟南芥基因组 DNA 的提取纯化与分析	/43
实验十	拟南芥叶片总 RNA 的提取纯化与分析	/49
实验十一	动物细胞总 RNA 的提取纯化与分析	/54
实验十二	血红蛋白的提取纯化及分析	/58
实验十三	藻蓝蛋白的提取、纯化及分析	/66
实验十四	酵母蔗糖酶的提取纯化及分析	/72
实验十五	大蒜超氧化物歧化酶的提取纯化与分析	/81
实验十六	Taq 酶的诱导提取纯化与分析	/85
实验十七	紫薯花青素的提取纯化及分析	/90
实验十八	利用荧光标记技术观察目的蛋白亚细胞定位	/97
实验十九	DNA 芯片技术分析基因组片段拷贝数差异	/105
实验二十	荧光实时定量 PCR 检测细胞 mRNA 的表达	/109
实验二十一	花序侵染法转化拟南芥	/114
实验二十二	应用 CRISPR/Cas9 技术构建基因敲除细胞株	/121
实验二十三	RNA 干扰靶基因表达对细胞的影响	/135
实验二十四	秀丽隐杆线虫 RNA 干扰技术	/145
实验二十五	GST pull-down 实验技术分析相互作用蛋白	/150
实验二十六	酵母双杂交技术在研究蛋白质相互作用中的应用	/155
实验二十七	细菌蛋白质组双向电泳分析体系的建立	/162
实验二十八	斑马鱼全胚原位杂交	/172
实验二十九	利用冰冻切片及免疫荧光观察动物组织结构	/180



实验三十 利用石蜡切片及免疫组化技术观察植物组织结构	/185
实验三十一 电压门控钠离子通道膜片钳实验	/191
实验三十二 利用电融合技术构建重组酵母菌株	/197
实验三十三 酵母细胞的固定化及发酵特性研究	/202
实验三十四 基于胶原蛋白的人工皮肤支架制备	/208
实验三十五 丝素蛋白提取及人工血管的制备	/211
附录	/216

实验一

大肠杆菌的培养及其生长曲线的测定

一、实验目的

1. 掌握大肠杆菌的常规培养方法。
2. 掌握光电比浊法测量细菌浓度的方法。
3. 通过绘制细菌生长曲线,了解细菌的生长规律。

二、实验原理与设计

细菌是最基本的生命形式之一,具备生命活动必需的细胞结构。细菌不仅可用于研究基础的生命活动,如 DNA 复制、转录、翻译等,还可以用来作为工程菌大量生产人类需要的特定蛋白质和代谢产物。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)是革兰氏阴性短杆菌,大小为 $0.5\text{ }\mu\text{m}\times 1\text{ }\mu\text{m}$ 至 $0.5\text{ }\mu\text{m}\times 3\text{ }\mu\text{m}$,周生鞭毛,能运动,无芽孢,能发酵多种糖类产酸、产气,是人和动物肠道中的正常栖居菌。大肠杆菌是研究微生物遗传的重要材料,如莱德伯格(J. Lederberg)采用两株大肠杆菌的营养缺陷型进行实验,发现了细菌的接合和遗传物质的重组;限制性内切酶的发现以及在此基础上开展的基因工程技术,极大地推动了生命科学和生物产业的发展。

实验室中常用的大肠杆菌菌株 K-12 MG1655 遗传背景清楚,基因组大小约为 4.6 Mb,共有 4 288 个基因。培养条件简单,适合大规模繁殖培养,是目前应用最广泛、最成功的外源基因表达宿主。表 1-1 列举了常用大肠杆菌基因工程菌株及其主要用途。

表 1-1 常用大肠杆菌基因工程菌株及其主要用途

菌株名称	主要用途
DH5 α 菌株	• DNA 酶缺陷型菌株,常用于保存质粒 • 蛋白酶没有缺陷,一般不用于蛋白质表达 • 用于重组体菌株筛选(蓝白斑筛选)
BL21(DE3) 菌株	• 用于高效表达克隆于含有噬菌体 T7 启动子的表达载体(如 pET 系列)的基因 • 该菌适合表达非毒性蛋白

续表

菌株名称	主要用途
JM109 菌株	• 常用于重组体菌株筛选(蓝白斑筛选)
TOP10 菌株	• 适用于高效的 DNA 克隆和质粒扩增,能保证高拷贝质粒的稳定遗传
HB101 菌株	• 该菌株遗传性能稳定,使用方便,适用于各种基因重组实验

在适宜的温度、pH 值、气体等条件下,细菌的生长常常要经历以下四个时期。

延迟期:细菌适应新环境,生长缓慢。

对数期:细菌繁殖速率很快,每 20 min 左右分裂一次,细菌总数呈几何级增加。

稳定期:受生长环境所限,因养分减少、代谢废物逐渐堆积等使得细菌分裂与死亡速度基本相当,细菌总数变化不大。

衰亡期:养分消耗殆尽,细菌死亡速率大大高于繁殖速率,使细菌总数呈几何级下降。

以培养时间为横坐标,以细菌数目的对数或生长速率为纵坐标作图所绘制的曲线称为该细菌的生长曲线。不同的细菌在相同的培养条件下其生长曲线不同,同样的细菌在不同的培养条件下所绘制的生长曲线也不相同。

测定细菌的生长曲线,了解其生长繁殖规律,这对人们根据不同的需要,有效地利用和控制细菌的生长具有重要意义。

绘制生长曲线一个重要的环节就是测定细胞数量,用于测定细菌细胞数量的方法主要有如下几种。

1. 计数器计数法 用 Petroff-Hauser 计数器或 Hawksley 计数器在显微镜油镜下直接进行细菌细胞计数,由于计数器的计数室容积是一定的,因而根据计数器刻度内的细菌数,可计算样品中的含菌数。此法迅速方便,但不能区分死菌与活菌,且总菌数若低于 10^6 /mL 时,准确度差。

2. 电子细胞计数器计数法 使用电子细胞计数器对菌液中的细胞自动进行计数。此法操作简单,但只能识别颗粒大小,不能区分活菌或死菌,也无法区别是否是细菌。

3. 测定细胞总氮量或总碳量计数法 氮、碳是细胞的主要成分,含量较稳定,测定氮、碳的含量可以推知细胞的质量。此法适于细胞浓度较高的样品。

4. 光电比浊计数法 根据菌悬液的透光量,间接地测定细菌的数量。细菌悬浮液的浓度在一定范围内与透光度成反比,与吸光度成正比,所以可用分光光度计测定菌液,用吸光度间接表示样品菌液浓度。通常 400~700 nm 都是微生物测定的范围,505 nm 测菌丝菌体、560 nm 测酵母、600 nm 测细菌。此法简便快捷,能得出相对的细菌数目,是实验室快速检测微生物数量最常用的方法。

5. 平板菌落计数法 此法根据每个活的细菌就能长出一个菌落的原理进行设计,是对活菌的计数。取一定容量的菌悬液,做一系列的倍比稀释,然后将定量的稀释液进行平板培养,根据培养出的菌落数,可算出培养物中的活菌数。此法灵敏度高,是一种常用的检测活菌数的方法,广泛应用于水、牛奶、食物、药品等各种材料的活菌检验。

本实验采用光电比浊法测定 TOP10 菌株的浓度并绘制其生长曲线(图 1-1)。难点在于如何克服器材、操作等带来的误差,得到相对准确的菌液吸光度。



图 1-1 细菌生长曲线实验流程图

三、实验仪器与材料

1. 实验试剂 NaCl、酵母提取物、胰蛋白胨、琼脂粉、甘油、去离子水、1 mol/L NaOH 等。
2. 实验仪器 超净工作台、高压蒸汽灭菌锅、移液器及枪头、酒精灯、接种环、涂布棒、显微镜、擦镜纸、容量瓶、pH 计、15 mL 离心管、分光光度计等。
3. 生物材料 大肠杆菌 TOP10 菌株。

四、实验操作与步骤

(一) 大肠杆菌 LB 培养基的配制

LB(Luria-Bertani)液体培养基: 分别称取酵母提取物 5 g, 胰蛋白胨 10 g, NaCl 10 g 后加入 950 mL 去离子水, 摇动容器直至各物质溶解; 用 1 mol/L NaOH 调 pH 值至 7.2; 用去离子水定容至 1 000 mL; 在 0.1 MPa、121 °C 下, 高压蒸汽灭菌 20 min。

LB 固体培养基: 在上述 LB 液体培养基中加入 15 g 琼脂粉后在 0.1 MPa、121 °C 下, 高压蒸汽灭菌 20 min。

LB 平板的制作: 待 LB 固体培养基灭菌后, 冷却至 60 °C 左右时, 在超净工作台内倒入已经灭菌干燥的平皿中, 体积约为平皿的 2/3, 该平板室温下干燥后即可用于细菌的培养。也可用封口膜密封后, 置于 4 °C 冰箱保存, 一个月内使用。

注意: 如该平板用于细菌的选择培养, 可在倒平板前, 加入适当浓度的抗生素。

(二) 大肠杆菌的活化、培养与保存

取 -80 °C 超低温冰箱保种的大肠杆菌, 室温下简单融化后, 用接种环挑取一环, 在 LB 固体平板上划线, 37 °C 倒置培养 12~16 h 后, 挑单菌落至 LB 液体培养基中, 37 °C, 220 r/min, 振荡培养 12~16 h, 可得一定浓度、已经活化的菌液。

细菌保存时, 可将菌液培养至对数生长期(吸光度约为 0.6)时取出, 与灭菌甘油 1:1 混合后, 分装至无菌冻存管中, 做好菌种名称、保存时间等标志后, 置于 -80 °C 超低温冰箱中冷冻保存, 一年内可以使用。

(三) 绘制细菌生长曲线

1. 实验准备

(1) 配制 LB 液体培养基, 并与离心管、枪头等一起在 0.1 MPa、121 °C 下, 高压蒸汽

灭菌 20 min。

(2) 将冻存的 TOP10 大肠杆菌按前述方法活化。

2. 接种菌液 用无菌移液器吸取 4 mL 已经活化的大肠杆菌过夜培养液(12~16 h),接入盛有 76 mL LB 液体培养基的三角瓶内,混合均匀后,分别取 3 mL 混合液放入 17 支一次性预灭菌离心管中。

3. 培养菌液 将已接种的离心管放入摇床内,37 ℃,150 r/min 下振荡培养,开始计时。每隔 1 h 取出一支试管,标记好培养时间后,立即放冰箱中贮存,最后一起测定其吸光度。

4. 吸光度测定 用未接种的 LB 液体培养基作空白对照,从最早取出的培养液依次开始,选用 600 nm 波长进行光电比浊测定。若有细菌培养液浓度比较大,吸光度超出 0.6 以上(吸光度在 0.1~0.6 之间呈线性关系,较可信),则可用 LB 液体培养基适当稀释后再测定,其实际吸光度应乘以稀释倍数。

5. 注意事项

(1) 接种及测定时,一定要将培养液振荡混匀,使细菌均匀分布。

(2) 每个时间点重复测量三次,取平均值。

将测定的 A_{600} 填入表 1-2:

表 1-2 各个培养时间段菌液的吸光度(A_{600})

培养时间/h	对照	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
吸光度 1																		
吸光度 2																		
吸光度 3																		
吸光度均值																		

6. 绘制生长曲线 以培养时间为横坐标,吸光度(A_{600})为纵坐标绘制细菌的生长曲线。

五、实验结果与讨论

1. 填写各个培养时间段菌液的吸光度(A_{600})表格(表 1-2)。

2. 根据表 1-2 绘制细菌生长曲线,并分析细菌各个生长时期的时间节点及生长特点。

3. 根据实验过程中的体会及实验原理分析本次实验的误差以及改进的方法。

六、参考资料

何岚,王柳懿,朱琪,等. 两种绘制枯草芽孢杆菌和大肠杆菌生长曲线方法的比较[J]. 天津农业科学,2017,23(5):14-18.

实验二

拟南芥的培养与观察

一、实验目的

1. 了解拟南芥的形态与生活史。
2. 学习并掌握拟南芥的培养技术。

二、实验原理与设计

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)为十字花科拟南芥属植物,因其植株小(高 20~25 cm)、生长周期短(2~3 个月)、自花授粉、种子多(每株可收 10 000 多颗种子)、生态类型丰富、分布广且容易进行诱变和遗传转化等特点被广泛用于植物分子遗传学、发育生物学和细胞生物学中,是植物生物学研究领域非常重要的模式植物之一,被称为“植物中的果蝇”。拟南芥也是第一个完成全基因组测序的有花植物,基因组大小为 125 Mb,是已知基因组最小的植物之一。

目前 ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center)、NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre)、SASSC (SENDAI Arabidopsis Seed Stock Center)等种子收藏中心收藏保存了来自全世界 750 多个拟南芥自然资源,其中 *Landsberg erecta* (Ler)、*Columbia* (Col)、*Wassilewskija* (Ws) 是生物学实验中使用最多的三个生态型(图 2-1), Col 生态型也是拟南芥全基因组测序中使用的品种。

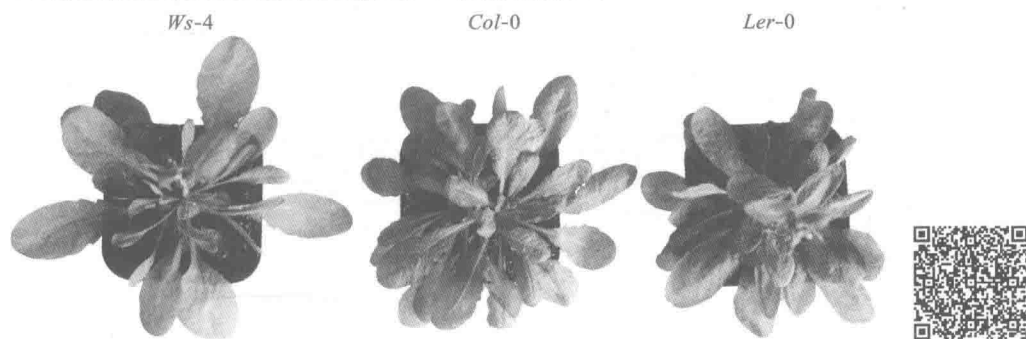


图 2-1 拟南芥的三种生态型

拟南芥的生长受温度、湿度、光照等影响,其生长的理想温度范围是 16~25 °C,最适

生长温度是 22~23 ℃；环境湿度在 25%~75% 时生长正常，湿度过高(超过 90%)会导致不育；拟南芥培养的光照时间一般为 8~24 h，在短光照周期(小于 12 h)条件下，偏向于营养生长，在长光照周期(12 h 以上)下，则有利于拟南芥转向生殖生长。对很多拟南芥生态型而言，播种后在 4 ℃ 低温条件下处理几天有利于种子打破休眠，将拟南芥幼苗放在 4 ℃ 低温条件下处理几周也有利于植株的开花，在幼苗长大之前可通过覆盖保鲜膜的方法来增加湿度一定程度上也有利于拟南芥生长。

拟南芥培养方法大致可以分为三种：第一种是直接把种子播种在土壤中(直播土培法)；第二种是先将种子播在无菌培养基上，再将幼苗移栽到土壤中(移栽法)；第三种则是直接将拟南芥种子播种在装有营养液的培养盒中(直播水培法)。

直播土培法按土壤性质可分为蛭石法和蛭石营养土混合培养法。蛭石法只用蛭石作为培养介质，蛭石的特性是质地疏松，通气性好，有利于小苗生根。但是由于其本身没有营养成分，蓄水能力不强，需要经常补充浇灌营养液，而且蛭石轻松，易于被水冲走，导致根部露出土面，影响小苗的生长，所以这种培养方法在拟南芥一般培养实验中不常用。蛭石营养土混合培养法是将蛭石与营养土按一定比例混合后作为培养介质，然后再直接将种子播种在里边，这样营养土可以为拟南芥植株的生长提供营养成分，蛭石可以起到疏松土壤的作用，这是拟南芥一般培养使用最多的方法。

移栽法是先将拟南芥种子表面消毒，然后播种在 MS 固体培养基上，待幼苗长到一定大小后，再移栽到培养土中正常培养生长，这种培养方法可以在移栽时挑选长势相同的植株，有助于提高后续实验的准确度。但是幼苗在移栽后需要对生长环境进行重新适应，而且幼苗比较脆弱，在移栽过程中很容易会对幼苗造成伤害，移栽后也需要精心呵护，因此对操作者的要求较高。这种方法常用于拟南芥种子萌发与筛选实验中。

直播水培法是直接将拟南芥播种在培养液中进行培养，可用于对植株进行高通量筛选实验中，这样可以避免将大批量幼苗移栽到培养土中造成的较大的工作量，这种方法也常用于不同条件处理下的拟南芥表型分析。

本实验拟采用蛭石营养土混合培养法，将拟南芥种子种植在培养土(从花卉市场购买的营养土与蛭石按 1 : 1 混合并消毒后分装而成)中，在人工设定的条件下培养，直至获得成熟种子(实验流程见图 2-2)。本实验的难点在于实验时间较长，需要有足够的耐心和责任心方能完成，而且种植经验的缺乏也容易导致实验中途失败。

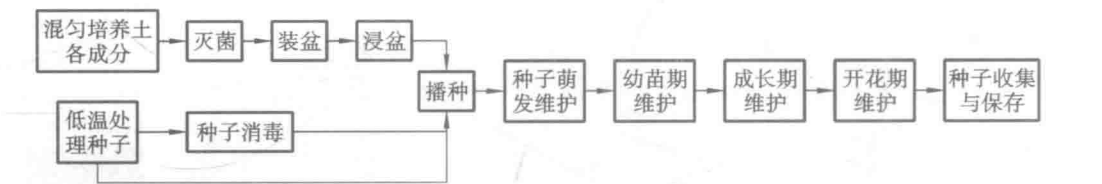


图 2-2 拟南芥培养流程

三、实验仪器与材料

1. 实验试剂 拟南芥培养营养液(配制方法见附录)。

2. 实验仪器 人工气候培养箱、空气加湿器、冰箱、培养用花盆、花盆托盘、塑料保鲜膜、营养土、蛭石等。

3. 实验材料 拟南芥种子(*Col-0*)(保存于 4 °C 冰箱)。

四、实验操作与步骤

1. 准备培养土 将营养土、蛭石按体积比 1:1 的比例混合均匀,加适量水使土壤潮湿,然后把准备好的培养土分装入花盆中,微振使之平整。

注意:

①配好的培养土在使用前可放在灭菌锅中高温处理 30 min 左右(具体时间视处理土的多少而定),等培养土完全冷却下来再装盆,使用前可以用保鲜膜覆盖,防止被其他种子或杂菌污染;

②培养土可在使用时按一定比例加入多菌灵(使用时要小心,注意戴口罩和手套,注意不要沾到衣服或皮肤上)混匀;

③盆土不可装太满,土面到花盆上沿留约 1.5 cm 即可。

2. 浸盆法浇水 将装好培养土的花盆置于托盘上,向托盘中注入适量水,使水沿着盆底的孔将盆土浸湿,适时向托盘中补充水,待盆土被完全浸润后,将托盘中多余的水倒去。

注意:浸盆的时候可将培养盆用保鲜膜覆盖,可过夜浸盆。

3. 播种 取出在冰箱中保存的拟南芥种子,放在纸槽上,小心将种子播撒在培养土表面,然后盖上保鲜膜,在膜上扎数个通气孔,便于保湿与通气,然后转移到 4 °C 条件下暗培养 2~3 天。

注意:

①播种时应使种子在花盆表面分布均匀,除用纸槽播种外,还可用稍微沾湿的竹签蘸取单粒种子点播于培养土表面;

②拟南芥种子直径较小,播种后不需覆土;

③若种子在 4 °C 冰箱中已保存一个月以上,可以直接播种。若冰箱中保存时间短,则需在湿润条件下放在 4 °C 冰箱中低温处理 3~4 天。

4. 种子萌发 将培养盆转移到人工气候培养箱中培养,在种子萌发前 3~4 天,将人工气候箱的条件设定为温度 22 °C,空气湿度 80%,光照强度调至 $60 \sim 100 \text{ mE} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$,然后将光周期调至 16 h 光照/8 h 黑暗,待拟南芥幼苗两片子叶长好后(约 5 天)揭开保鲜膜。

5. 培养维护 保持人工气候培养箱设置不变,每隔 2~3 天浇一次水,直到拟南芥开花。

注意:

①拟南芥不耐旱,应及时浇水,但也应注意盆土不干不浇,以利于壮根;

②由于种子和幼苗较小,易被冲走,因此采用向托盘注水的方法补水,但托盘中不能留有太多积水,因为湿度太大会影响拟南芥的生长,每次加的水以刚好被培养土吸干为宜;



③为保证拟南芥幼苗能正常生长,也可每隔一星期左右给拟南芥植株叶片喷洒营养液,开花期也应及时追肥;

④培养过程中,注意用 70%酒精涂擦气候箱内的培养架,并及时将有病虫害的植株移出气候箱。

6. 种子收集与保存 待 90%果荚开始变黄后停止浇水,剪取果荚,待果荚完全干枯、种子干燥后,弃去果荚,小心将种子收集到 1.5 mL 离心管中,在管上标明相关信息。放入 4℃冰箱保存。

五、实验结果与讨论

1. 整个培养过程历时约 17 周,在此期间注意对培养环境因素以及拟南芥生长状态、变化、时期的观察与记录,总结并完成下表:

植株 序号	播种 时间	发芽 时间	第一片 真叶 长出时间	发芽 率	成活 率	始花 时间	开花时 株高	莲座 直径	果荚 长度	每荚 种子数	果荚 数量	生活 周期

2. 比较各植株的生长状况,对整个实验过程进行分析。

六、参考资料

[1] Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the Genome Sequence of the Flowering Plant *Arabidopsis thaliana* [J]. Nature, 2000, 408(6814): 796-815.

[2] 李俊华, 张艳春, 徐云远, 等. 拟南芥室内培养技术 [J]. 植物学通报, 2004, 21(2): 201-204.

[3] Lefebvre V, Kiani SP, Durand-Tardif M. A Focus on Natural Variation for Abiotic Constraints Response in the Model Species *Arabidopsis thaliana* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2009, 10(8): 3547-3582.

[4] Weigel D, Glazebrook J. *Arabidopsis: A Laboratory Manual* [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009: 172-176.

[5] Yin L, Fristedt R, Herdean A, et al. Photosystem II Function and Dynamics in Three Widely Used *Arabidopsis thaliana* Accessions [J]. PLoS One, 2012, 7(9): e46206.

[6] Sanchez-Serrano JJ, Salinas J. *Arabidopsis Protocols* [M]. New Jersey: Humana Press, 2014: 3-25.