

国家级实验教学示范中心植物学科系列实验教材



Zhiwu Binglixue
Yanjiu Jishu

植物病理学 研究技术



张铨哲 冉隆贤 李永刚 主编
廖晓兰 易图永 张俊华



北京大学出版社
PEKING UNIVERSITY PRESS

国家级实验教学示范中心植物学科系列实验教材

植物病理学研究技术

主 编	张铉哲	冉隆贤	李永刚
	廖晓兰	易图永	张俊华
副主编	甄志先	杜绍华	李会平
	王 芳		



北京大学出版社
PEKING UNIVERSITY PRESS

图书在版编目(CIP)数据

植物病理学研究技术/张铉哲等主编. —北京: 北京大学出版社, 2015. 8
(国家级实验教学示范中心植物学科系列实验教材)
ISBN 978-7-301-26023-4

I. ①植… II. ①张… III. ①植物病理学—高等学校—教材 IV. ①S432.1
中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 147089 号



书 名 植物病理学研究技术
著作责任者 张铉哲 冉隆贤 李永刚 廖晓兰 易图义 张俊华 主 编
责任编辑 张 敏
标准书号 ISBN 978-7-301-26023-4
出版发行 北京大学出版社
地 址 北京市海淀区成府路 205 号 100871
网 址 <http://www.pup.cn> 新浪微博: @北京大学出版社
电子信箱 zpup@pup.cn
电 话 邮购部 62752015 发行部 62750672 编辑部 62765014
印 刷 者 北京大学印刷厂
经 销 者 新华书店
787 毫米×1092 毫米 16 开本 13.75 印张 356 千字
2015 年 8 月第 1 版 2015 年 8 月第 1 次印刷
定 价 30.00 元

未经许可, 不得以任何方式复制或抄袭本书之部分或全部内容。
版权所有, 侵权必究
举报电话: 010-62752024 电子信箱: fd@pup.pku.edu.cn
图书如有印装质量问题, 请与出版部联系, 电话: 010-62756370

国家级实验教学示范中心植物学科系列 实验教材编写委员会

主 任 张宪省 (山东农业大学)
吴伯志 (云南农业大学)

副主任 李 滨 (山东农业大学)
崔大方 (华南农业大学)
杨立范 (北京大学出版社)

委 员 (按姓氏笔画排列)
张宪省 (山东农业大学)
吴伯志 (云南农业大学)
项文化 (中南林业科技大学)
李 滨 (山东农业大学)
李保同 (江西农业大学)
杨立范 (北京大学出版社)
杨学举 (河北农业大学)
肖建富 (浙江大学)
张金文 (甘肃农业大学)
陈建斌 (云南农业大学)
邹德堂 (东北农业大学)
周 琴 (南京农业大学)
崔大方 (华南农业大学)
彭方仁 (南京林业大学)
蔺万煌 (湖南农业大学)
燕 玲 (内蒙古农业大学)

前 言

植物病理学研究技术是一门科学性和实用性很强的课程,其中实验课程是其重要部分。随着各农业院校对实践教学日益重视,实验课程在整个教学过程中所占的比重也越来越大。植物病理学实践教学中一直缺少一本实用性极强的植物病理学研究技术实验指导书,给教学工作带来诸多不便。本教材包括植物病理学研究技术的理论和实验内容,旨在帮助学生掌握和理解植物病理学研究技术的基础理论知识、掌握基本实验操作技能。理论部分包括植物病理学实验室规章及仪器的使用、植物病害的诊断与病原物鉴定和保存、植物病害的发生与发展规律的研究、植物病害防治和科技论文写作等 5 个部分;实验部分包括植物病理学实验仪器的使用及注意事项、植物病害症状观察与临时玻片标本的制作、标本采集、植物病原菌检测与鉴定、病原物的保存和接种、各种致病性酶、毒素和生长调节物质对病害发生的影响、各种酶活性对植物抗病性的影响、各种环境因子对植物病害发生的影响和各种植物病害的防治技术。

全书共包括 5 章理论部分和 39 个实验项目,其中:前言,第三章理论部分和实验 3-4~3-6 由东北农业大学张铨哲教授编写,实验 3-1~3-3,3-7~3-9 由齐齐哈尔大学王芳讲师编写;第一章理论部分由东北农业大学李永刚副教授编写;第二章理论部分和大多数实验部分(除实验 2-5)由湖南农业大学廖晓兰教授编写,实验 2-5 由东北农业大学张俊华教授编写;第四章植物病害检疫的理论部分和实验 4-1~4-4 由河北农业大学甄志先副教授编写,实验 4-5 和 4-6 由湖南农业大学易图永教授编写,实验 4-7~4-11 由河北农业大学杜绍华讲师编写,实验 4-12~4-16 由河北农业大学李会平副教授编写,实验 4-17 由河北农业大学冉隆贤教授编写;第五章第一节到第三节理论部分和实验部分由湖南农业大学易图永教授编写,第五章第四节由河北农业大学冉隆贤教授编写。

本书由东北农业大学、河北农业大学、湖南农业大学、齐齐哈尔大学等院校的 10 名长期从事农业植物病理学教学的人员共同编写而成。本书是在国家级实验教学示范中心植物学科组的领导下,由北京大学出版社组织全国农林植物类教学示范中心的院校集体讨论编写的。感谢东北农业大学、河北农业大学、湖南农业大学等院校领导、教务处、教学示范中心及学校老师的大力支持;也要感谢本书编辑北京大学出版社的张敏老师对本书组织编写、审读加工所付出的辛勤劳动。

由于编者水平有限,加之时间仓促,错误和不足之处在所难免,敬请同行和读者提出宝贵意见,以期进一步修改完善。

张铨哲

2015 年 8 月

目 录

第一章 植物病理学实验仪器的使用及注意事项	(1)
第二章 植物病害的诊断与病原物鉴定保存	(28)
第一节 植物病害的诊断	(28)
第二节 植物病原物的检测与鉴定	(33)
第三节 植物病害诊断及病原鉴定的程序	(34)
第四节 植物病害的诊断和病原物鉴定的原则及方法	(37)
第五节 植物病害标本的采集制作与病原物的保存	(44)
第六节 植物病原物的接种	(58)
实验 2-1 植物病害症状观察与临时玻片标本的制作	(65)
实验 2-2 植物病害标本采集制作	(68)
实验 2-3 植物病原真菌的常规检测与鉴定	(69)
实验 2-4 植物病原细菌 16S rDNA 的检测与鉴定	(75)
实验 2-5 植物病原病毒的检测与测定	(78)
实验 2-6 植物病原线虫的检测与鉴定	(86)
实验 2-7 植物病原物的保存	(92)
实验 2-8 植物病原物的接种	(96)
第三章 植物病害发生与流行规律的研究	(98)
第一节 植物病原菌的致病性研究	(98)
第二节 植物的抗病性研究	(99)
第三节 病害流行规律的研究	(100)
实验 3-1 水稻纹枯病菌分泌的细胞壁降解酶的提取及其对植物病害发生的影响	(103)
实验 3-2 茄子黄萎病菌分泌的毒素提取与其对植物病害发生的影响	(106)
实验 3-3 水稻白叶枯病菌分泌的内源激素的提取与其对植物病害发生的影响	(108)
实验 3-4 不同接种方法对植株抗病性表现的影响	(111)
实验 3-5 各种酶活性对植物抗病性的影响	(112)
实验 3-6 不同温度对植物病害发生的影响	(116)
实验 3-7 不同湿度对植物病害发生的影响	(117)
实验 3-8 不同光照强度对植物病害发生的影响	(118)
实验 3-9 不同 pH 对植物病害发生的影响	(120)
第四章 植物病害防治研究技术	(122)
第一节 植物病害检疫	(123)
第二节 植物抗病育种	(123)

第三节 农业防治措施	(125)
第四节 植物病害的物理防治	(126)
第五节 植物病害化学防治	(127)
第六节 植物病害生物防治	(127)
第七节 植物诱导抗病性	(128)
实验 4-1 植物病原真菌及卵菌的检验	(129)
实验 4-2 植物病原细菌的检验	(133)
实验 4-3 植物病原病毒的检验	(137)
实验 4-4 植物寄生线虫的检验	(140)
实验 4-5 田间调查不同品种对水稻纹枯病的抗性测定	(143)
实验 4-6 病原物致死温度的测定	(145)
实验 4-7 杀菌剂对植物病原菌的室内生物活性测定	(147)
实验 4-8 杀细菌剂的室内生物活性测定	(149)
实验 4-9 抗病毒物质生物学筛选法	(150)
实验 4-10 杀线虫剂的室内生物测定	(151)
实验 4-11 植物病原菌对化学杀菌剂的抗药性测定	(153)
实验 4-12 植物病害生防菌的分离与培养	(155)
实验 4-13 植物病害生防菌的室内拮抗作用测定	(158)
实验 4-14 植物病害生防菌的温室生防效果测定	(160)
实验 4-15 生防菌的发酵与扩繁	(162)
实验 4-16 植物源杀菌剂的筛选及生物活性测定	(166)
实验 4-17 植物诱导抗病技术	(168)
第五章 科技写作	(171)
第一节 实验报告	(171)
第二节 科技论文写作	(173)
第三节 数据处理	(175)
第四节 科研申请书	(176)
实验 5-1 文献资料查询	(179)
实验 5-2 DPS 分析软件使用	(185)
实验 5-3 系统发育树的构建	(189)
实验 5-4 蛋白质序列分析与结构预测	(196)
实验 5-5 科技论文的写作	(200)
附录 植物病理学实验室规章制度	(201)
参考文献	(208)

第一章 植物病理学实验仪器的使用及注意事项

一、灭菌仪器的使用及注意事项

灭菌的方法基本上分为两大类：物理方法(湿热灭菌、干热灭菌、射线灭菌、滤过灭菌)和化学方法(气体灭菌、药液灭菌)。

表 1-0-1 热力消毒灭菌法比较

方 法	温度/℃	时 间	灭菌器	适用物品
焚烧	>500	瞬时		废弃物品、动物尸体灭菌
干烤	160~170	120 min	干热灭菌器(干烤箱)	玻璃器材、瓷器等灭菌
巴氏消毒法	75~90	15~16 s		牛奶、酒类等消毒
煮沸消毒法	100	5 min		食具、刀剪、注射器等消毒
流通蒸汽消毒法	100	15~30 min	Arnold 流通蒸汽灭菌器	食具等消毒
间歇灭菌法	100	30 min	流通蒸汽灭菌器(重复 3 次)	不耐高温的含糖、牛奶等培养基
高压蒸汽灭菌法	121	15~30 min	高压蒸汽灭菌器	耐高温、高压及不怕潮湿的物品

(一) 湿热灭菌器

1. 灭菌原理

水在大气中 100℃左右沸腾,水蒸气压力增加,沸腾时温度将随之增加。因此,在密闭的高压蒸汽灭菌器内,当压力表指示蒸汽压力增加到 15 磅^①(1.05 kg/cm²)时,温度相当于 121.3℃,在这种温度下,20 min 即可导致菌体蛋白质凝固变性,从而达到完全杀死细菌的繁殖体及芽孢的目的。



大型湿热灭菌器



小型湿热灭菌器

图 1-0-1 湿热灭菌器

① 严格意义上讲磅应为磅力。1 磅力(lbf)=4.44822 牛(N)。

高压蒸汽灭菌主要优点是：① 温度较高，灭菌所需时间较短；② 蒸汽穿透力强；③ 蒸汽冷凝时释放汽化热，能迅速提高物品的温度；④ 物品不过分潮湿。

2. 灭菌器的使用

① 使用前的准备。灭菌器内清洗干净，检查进气阀及排气阀是否灵活有效，并加入适量水。

② 装放灭菌物。将待灭菌的物品放入灭菌器内，注意不要放得太挤，以免影响蒸汽的流通和灭菌效果。然后加盖旋紧螺旋，密封。

③ 预热及排气。加热升温使水沸腾，并由小至大打开排气管（排气阀），排除冷空气，继续加热升温，再关闭排气管（阀）。

④ 升压保温。让温度随蒸汽压力增高而逐渐上升，待蒸汽压力升至所需压力（一般为 103.43 kPa，温度相当于 121.3℃）时，控制热源，维持所需时间，持续 15~20 min 即可达到灭菌目的。

⑤ 降压开盖取物。保压到规定时间之后，停止加热，缓缓排气，待其压力下降至零时，方可开盖取物。

3. 灭菌器使用注意事项

① 此法灭菌是否彻底的一个关键是压力上升之前，必须先把蒸汽锅内的冷空气完全驱尽，否则，即使压力表已指到 103.43 kPa，而锅内温度则只有 100℃，这样芽孢不能被杀死，造成灭菌不彻底，所以必须进行排气。

② 降压一般通过自行冷却。如果时间来不及，可以稍开排气阀降压，但排气阀不能开得太，排气不能过急，否则灭菌器内骤然降压，灭菌物内的液体会突然沸腾，将棉塞冲湿，甚至外流。

③ 另外，降压时压力表上读数虽已降至“0”，灭菌物内温度有时还会在 100℃ 以上，如果开锅太快还有沸腾的可能，所以最好在降压后再稍停一会，灭菌物温度下降后再出锅较妥当。灭菌物灭菌后仍处于高温时，容器内呈真空状，降温过程中外部空气要重新进入容器，一般叫“回气”，降温过快，回气就急，如封口膜不严密，空气中杂菌就会重新进入灭菌物使其污染，这往往造成高压蒸汽灭菌的失败。因而降压开盖取物不宜过急。

④ 高压灭菌器内的物品不得放的过满，否则影响灭菌效果。放好被消毒灭菌的物质后，高压灭菌器的盖子或门尽量拧紧。

⑤ 实验室高压灭菌器由三级生物安全防护实验室管理员定期检查，以确保高压灭菌器正常工作，防止意外事故发生，保证消毒灭菌效果。

⑥ 使用前要检查电源是否正常并向水箱内注水至额定水位线。通常水位应在高低水位线中间偏上位置，可避免中途补水。消毒物品放入锅内后要关门锁紧。

⑦ 消毒锅用压力表、安全阀应每半年由质检部门校检一次，发现问题及时排除。密封圈老化造成漏气时应及时更换以保证消毒效果。

⑧ 无菌包不宜过大（小于 50 cm×30 cm×30 cm），不宜过紧，各包裹间要有间隙，使蒸汽能对流易渗透到包裹中央。消毒前，打开贮槽或盒的通气孔，有利于蒸汽流通。而且排气时使蒸汽能迅速排出，保持物品干燥。消毒灭菌完毕，关闭贮槽或盒的通气孔，以保持物品的无菌状态。

⑨ 布类物品应放在金属类物品上，否则蒸汽遇冷凝聚成水珠，使包布受潮。阻碍蒸汽进入包裹中央，严重影响灭菌效果。

⑩ 定期检查灭菌效果。经高压蒸汽灭菌的无菌包、无菌容器有效期以 1 周为宜。

4. 应用范围

高压蒸汽灭菌可用于耐高温、高压及不怕潮湿的物品,如普通培养基、生理盐水、纱布、敷料、手术器械、玻璃器材、隔离衣等的灭菌。

(二) 干热灭菌器

利用火焰或干热空气进行灭菌,称为干热灭菌。本法系指物品于干热灭菌器(柜)、烘箱、隧道灭菌器等设备中灭菌,由于空气是一种不良的传热物质,其穿透力弱,且不太均匀,所需的灭菌温度较高,时间较长,所以容易影响灭菌材料的理化性质。



图 1-0-2 干热灭菌器

1. 灭菌原理

加热可破坏蛋白质和核酸中的氢键,导致核酸破坏,蛋白质变性或凝固,酶失去活性,微生物因而死亡。

2. 灭菌要求

① 通常的灭菌条件。一般 140°C , 至少 3 h; $160\sim 170^{\circ}\text{C}$, 不少于 2 h; $170\sim 180^{\circ}\text{C}$, 不少于 1 h; 250°C , 45 min 以上。如繁殖性细菌用 100°C 以上的干热空气干热 1 h 可被杀灭。对耐热性细菌芽孢,在 140°C 以上,灭菌效率急剧增加。

② 生产中,在保证灭菌完全、并对被灭菌物品无损害的前提下,拟订灭菌条件。对耐热物品,可采用较高的温度和较短的时间;而对热敏性材料,可采用较低的温度和较长的时间。

3. 灭菌器的使用

- ① 打开灭菌器的门,将灭菌材料放入其中,注意留有空隙,关上门。
- ② 打开电源开关,根据材料性质及要求,设置相应温度及时间。
- ③ 打开风机,关闭风门。
- ④ 灭菌完毕后,待温度降至 40°C 左右,打开门,取出材料。

4. 灭菌器使用注意事项

- ① 灭菌前应需灭菌的器具洗净包严,被灭菌的药品要分装密封,置于烘箱中。
- ② 四周不靠箱壁。灭菌结束后,应缓慢降温至 40°C 左右时,取出被灭菌的物品。
- ③ 灭菌材料要洗净和晾干,不能有水珠。

5. 应用范围

① 凡应用湿热方法灭菌无效的非水性物质、极黏稠液体、或易被湿热破坏的药物,宜用本法灭菌,如油类、固体试药、液状石蜡、软膏基质或粉末等。宜用干热空气灭菌的,由于本法灭菌温度高,故不适用于对橡胶、塑料制品及大部分药物的灭菌。

② 玻璃器皿、金属制容器、纤维制品,如西林瓶、安瓿瓶和铝瓶等灭菌。

(三) 细菌滤器灭菌

细菌滤器是用物理方法阻止液体或空气中的细菌通过的特制的仪器,又称滤菌器。是微生物实验室中不可缺少的一种仪器。

常用的有蔡(Seitz)氏滤菌器(由石棉板制成)、白克非(Berkefeld)氏滤菌器(由硅藻土和石棉混合制成)、张伯伦(Chamberland)氏滤菌器(由白陶土和硅砂混合制成)、玻璃滤菌器(由玻璃细砂黏合制成)和薄膜滤菌器(用醋酸纤维作成薄膜装在金属滤菌器上而成)。

1. 灭菌原理

细菌都有一定的大小,如果过滤器的滤膜,或者滤柱(或者其他的)孔径小于细菌的直径,那么当液体或者气体通过的时候,细菌就被挡住过不去,通过的液体或者气体就是无菌的。有两种原理:一种是深层滤器,是用石棉(Seitz式)、陶瓷(Chamberland式)、硅藻土(Berkefeld式)等为基本材料,使微生物通过由这种材料构成的弯道而被滤除,因此从原理上讲不可能将微生物除净,只能除去98%左右的规定粒径以上的微生物;另一种是纤维素膜滤器,即在以醋酸纤维素为主要材料的具有均一孔径的穴孔的人工膜上,使超过孔径限度以上的微生物不能通过,故可以绝对滤过。此外,就滤过材料而言,深层滤器难免有一部分流往滤液中,而纤维素膜滤器几乎不发生这种情况。

2. 灭菌要求

① 目前,混合纤维素酯滤膜用得最多,其特性是耐120℃,30 min灭菌;无脱屑;不耐碱;不耐有机溶剂;易燃。

② 根据过滤的量选择相应型号的过滤器,从小型注射器式到大型蠕动泵式。

③ 如果液体中颗粒状物或微生物量较多,要先适当离心(3000~5000 r/min)后,才可用过滤器。

3. 灭菌器的使用

① 将清洁的滤器和滤膜安装好,用封口膜或纸封住两端,小型的用纸包好或放入密封的可灭菌的容器中,15磅压力一次蒸汽灭菌20 min。

② 取出冷却后,放入无菌操作台,去掉过滤主体部分上端的封口膜或纸,连接蠕动泵。将接取无菌滤液的灭过菌的容器放入操作台,打开紫外灯,灭菌20 min。

③ 将要过滤的微生物培养液进行离心(3000~5000 r/min)去掉部分较大粒体,然后,倒入烧杯中,将蠕动泵管的另一端插入液体。

④ 关闭紫外灯,取下过滤器主体部分下端的封口膜或纸,将灭过菌的容器放在其下面,打开蠕动泵开关,待液体接近过滤器主体部分时,关闭过滤器顶部通气阀,注意容器的容量,及时更换容器。

⑤ 过滤完毕后,用清水冲洗干净后,再用蒸馏水冲洗,晾干。

4. 灭菌器使用注意事项

- ① 过滤器主体部分灭菌前螺丝不能太紧,以免热胀冷缩,损坏仪器。
- ② 放置滤膜时要多加小心,以免弄破,灭菌失败。

5. 应用范围

可以用来去除糖溶液、微生物培养液、血清、腹水及其他不耐热培养液中的细菌,用于对不耐热液体进行过滤灭菌。

二、检测类仪器的使用及注意事项

(一) 酶联免疫仪(酶标仪)

1. 酶联免疫仪的原理

酶标仪实际上就是一台变相的专用光电比色计或分光光度计,其基本工作原理与主要结构和光电比色计基本相同。光源灯发出的光波经过滤光片或单色器变成一束单色光,进入塑料微孔极中的待测标本。该单色光一部分被标本吸收,另一部分则透过标本照射到光电检测器上,光电检测器将这一待测标本不同强弱的光信号转换成相应的电信号。电信号经前置放大,对数放大,模数转换等信号处理后送入微处理器进行数据处理和计算,最后由显示器和打印机显示结果。



图 1-0-3 酶联免疫仪

2. 酶联免疫仪的使用

- ① 开启仪器电源开关,预热 5 min,同时启动电脑。
- ② 启动 Magellan.exe 程序,进入程序主界面,仪器微孔板架同时自动打开。
- ③ 将待测微孔板在板架上放好。
- ④ 根据不同的测量要求,设置好测定波长和测量模式后,进行检测。
- ⑤ 保存检测结果或进行打印。
- ⑥ 关闭计算机和主机电源,登记使用记录。

3. 酶联免疫仪使用注意事项

① 仪器应放置在低于 40 分贝的环境下。为延缓光学部件的老化,应避免阳光直射。操作时环境温度应在 15~40℃ 之间,环境湿度在 15%~85% 之间。操作电压应保持稳定。

② 操作环境空气清洁,避免水汽,烟尘。保持干燥、干净、水平的工作台面,以及足够的操作空间。

③ 使用加液器加液,加液头不能混用。洗板要洗干净。如果条件允许,使用洗板机洗板,避免交叉污染。

④ 严格按照试剂盒的说明书操作,反应时间准确。

⑤ 在测量过程中,请勿碰酶标板,以防酶标板传送时挤伤操作人员的手。请勿将样品或试剂洒到仪器表面或内部,操作完成后请洗手。如果使用的样品或试剂具有污染性、毒性和生物学危害,请严格按照试剂盒的操作说明,防止对操作人员造成损害。如果仪器接触过污染性或传染性物品,请进行清洗和消毒。

⑥ 不要在测量过程中关闭电源。

⑦ 对于因试剂盒问题造成的测量结果的偏差,应根据实际情况及时修改参数,以达到最佳效果。

⑧ 使用后盖好防尘罩。出现技术故障时应及时与厂家联系,切勿擅自拆卸酶标仪。

4. 应用范围

本仪器可做基因检验、血清学检测和农残检验项目等。

(二) 分光光度计

分光光度计可分为原子吸收分光光度计、荧光分光光度计、可见分光光度计、红外分光光度计、紫外可见分光光度计几种,不同的分类有不同的应用领域。

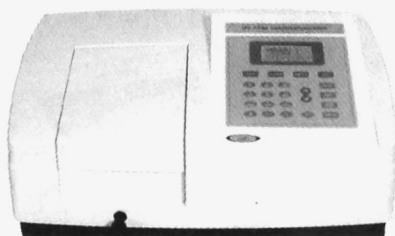


图 1-0-4 分光光度计

1. 分光光度计的原理

分光光度计的原理是由一光源产生的连续辐射光经单色器分光后照射到样品池上,经过池中样品时会产生吸收,吸收的多少与分析物的浓度有关,这样经过样品池的出射光由检测器检测就可得到分析信号。然后再对分析信号做一些处理就可得到分析结果。

2. 分光光度计的使用

① 预热仪器。为使测定稳定,将电源开关打开,使仪器预热 20 min,为了防止光电管疲劳,不要连续光照。预热仪器时和在不测定时应将比色皿暗箱盖打开,使光路切断。

② 选定波长。根据实验要求,转动波长调节器,使指针指示所需要的单色光波长。

③ 固定灵敏度档。根据有色溶液对光的吸收情况,为使吸光度读数为 0.2~0.7,选择合适的灵敏度。为此,旋动灵敏度档,使其固定于某一档,在实验过程中不再变动。一般测量固定在“1”档。

④ 调节“0”点。轻轻旋动调“0”电位器,使读数表头指针恰好位于透光度为“0”处(此时,比色皿暗箱盖是打开的,光路被切断,光电管不受光照)。

⑤ 调节 $T=100\%$ 。将盛有蒸馏水(或空白溶液、或纯溶剂)的比色皿放入比色皿座架中的第一格内,有色溶液放在其他格内,把比色皿暗箱盖子轻轻盖上,转动光量调节器,使透光度 $T=100\%$,即表头指针恰好指在 $T=100\%$ 处。

⑥ 测定。轻轻拉动比色皿座架拉杆,使有色溶液进入光路,此时表头指针所示为该有色溶液的吸光度 A 。读数后,打开比色皿暗箱盖。

⑦ 关机。实验完毕,切断电源,将比色皿取出洗净,并将比色皿座架及暗箱用软纸擦净。

3. 分光光度计使用注意事项

① 为了防止光电管疲劳,不测定时必须将比色皿暗箱盖打开,使光路切断,以延长光电管使用寿命。

② 比色皿的使用方法。拿比色皿时,手指只能捏住比色皿的毛玻璃面,不要碰比色皿的透光面,以免玷污;清洗比色皿时,一般先用水冲洗,再用蒸馏水洗净,如比色皿被有机物玷污,可用盐酸-乙醇混合洗涤液(1:2)浸泡片刻,再用水冲洗,不能用碱溶液或氧化性强的洗涤液洗比色皿,以免损坏,也不能用毛刷清洗比色皿,以免损伤它的透光面。每次做完实验时,应立即洗净比色皿;比色皿外壁的水用擦镜纸或细软的吸水纸吸干,以保护透光面;测定有色溶液吸光度时,一定要用有色溶液洗比色皿内壁几次,以免改变有色溶液的浓度,另外,在测定一系列溶液的吸光度时,通常都按由稀到浓的顺序测定,以减小测量误差;在实际分析工作中,通常根据溶液浓度的不同,选用液槽厚度不同的比色皿,使溶液的吸光度控制在 $0.2\sim 0.7$ 。

4. 应用范围

可广泛用于药品检验,药物分析,环境检测,卫生防疫食品、化工、科研等领域,对物质进行定性、定量分析,是生产、科研、教学的必备仪器。

(三) PCR 仪

1. PCR 仪的原理

基本原理类似于 DNA 的天然复制过程,其特异性依赖于与靶序列两端互补的寡核苷酸引物。PCR 由变性—退火—延伸三个基本反应步骤构成:模板 DNA 的变性——模板 DNA 经加热至 93°C 左右一定时间后,使模板 DNA 双链或经 PCR 扩增形成的双链 DNA 解离,使之成为单链,以便它与引物结合,为下轮反应作准备;模板 DNA 与引物的退火(复性)——模板 DNA 经加热变性成单链后,温度降至 55°C 左右,引物与模板 DNA 单链的互补序列配对结合;引物的延伸——DNA 模板与引物结合物在 TaqDNA 聚合酶的作用下,以 dNTP 为反应原料,靶序列为模板,按碱基配对与半保留复制原理,合成一条新的与模板 DNA 链互补的半保留复制链。重复循环变性—退火—延伸三过程,就可获得更多的“半保留复制链”,而且这种新链又可成为下次循环的模板。每完成一个循环需 $2\sim 4\text{ min}$, $2\sim 3\text{ h}$ 就能将待扩目的基因扩增放大几百万倍。到达平台期所需循环次数取决于样品中模板的拷贝。

2. PCR 的使用

① 开机。打开开关,视窗上显示“SELF TEST”,显示 10 s 后,显示 RUN—ENTER 菜单:“RUN ENTER PROGRAM PROGRAM”准备执行程序。

② 放入样本管,关紧盖子。



图 1-0-5 PCR 仪

③ 如果要运行已经编好的程序,则直接按“Proceed”,用箭头键选择已储存的程序,按“Proceed”,则屏幕显示:“—ENABLE DISABLE HEATED LID”按“Proceed”选择 ENABLE,则开始执行程序。

④ 如果要输入新的程序,则在 RUN—ENTER 菜单上用箭头键选择 ENTER PROGRAM,按“Proceed”,屏幕显示“—NEW LIST EDIT DELET”,按“Proceed”选择 NEW,命名新的程序,最多 8 个字母,输入后按“Proceed”确认。

⑤ 输入程序步骤:名字输入后,显示“STEP1_TEMP GOTO OPTION END”,按“Proceed”则可以输入温度($0\sim 100^{\circ}\text{C}$),按“Proceed”确认后,则可以输入孵育时间,用“Select”键移动光标,输入数字,完成后按“Proceed”确认,跳到下一步,输入方式同上。

⑥ 选择 GOTO,输入循环步骤时链接到第几步(循环数最多可达 9999 次)(为实际循环数-1)。

⑦ 选择 Option,显示“STEP EXTEND INCREMENT SLOPE”再选择 increment,按“Proceed”确认,输入初始的温度,确认后输入时间,按“Proceed”确认,然后输入每个循环增加或减少的温度,增加用正值,减少用负值($-0.1\sim 6^{\circ}\text{C}$),按“Proceed”确认。选择 extend,按“Proceed”确认,输入每个循环增加或减少的时间($-60\sim 60\text{ s}$),按“Proceed”确认。

选择 Slop(指温度上升或下降的速率),输入温度的改变值($-0.1\sim 1.5^{\circ}\text{C}$),按“Proceed”确认,然后输入加热或制冷的速度,按“Proceed”确认。

⑧ 选择 End,输入结束步骤。

⑨ 输入完成的程序后,到 RUN—ENTER 菜单,选择新程序,开始运行。

⑩ 其他。用“Pause”可以暂停一个运行的程序,再按一次继续程序,用“Stop”或“Cancel”可停止运行的程序。

3. 编辑程序

① 可以用“Cancel”键删除输错的值,输入新的值后按“Proceed”确认。

② 对于未输完的程序,要先输入 END,按“Proceed”将程序储存后才能删除。

③ 删除已经储存的程序。从 RUN—ENTER 菜单中选择 RUN—PROGRAM,按“Proceed”,显示主菜单,选择 DELETE,用“Select”选择删除。

④ 查看程序的步骤。在主菜单上选择 LIST,按“Proceed”,用“Select”将选择名称,再按

“Proceed”，显示程序的第一步，用“Select”键向前、向后翻页查看，此时不能改变程序的值。

4. 编辑已有的程序

① 从 RUN—ENTER 菜单中选择 RUN—PROGRAM，按“Proceed”，显示主菜单，选择 EDIT，按“Proceed”确认，用“Select”键选择要编辑的程序，按“Proceed”显示程序的第 1 步。

② 用“Select”键将光标移到要改变的温度或循环的值上，键入新值，按“Proceed”确认，按“Cancel”删除键入的值，出现空格，键入新值后确认。注意，一旦值被改变或删除，原来的值不能恢复，必须重新键入。

③ 编辑时间值。必须重新键入 h、min、s，按“Proceed”。

5. 设置一个 PCR 体系

① 预变性。可用 $94\sim 95^{\circ}\text{C}$ ， $2\sim 10\text{ min}$ ，一般用 5 min 。

② 变性。一般用 94°C ， $30\text{ s}\sim 2\text{ min}$ ，一般用 $45\text{ s}\sim 1\text{ min}$ 。

③ 退火。温度自定， $30\text{ s}\sim 2\text{ min}$ 。

④ 延伸。 $70\sim 75^{\circ}\text{C}$ ，一般 72°C ，对于 $<2\text{ kb}$ ， $<1\text{ min}$ ； $>2\text{ kb}$ ，每增加 1 kb 加 1 min 。

⑤ 循环数。一般 $25\sim 35$ 个循环。

⑥ 最终延伸。 72°C ， $5\sim 15\text{ min}$ 。

⑦ 保存。 10°C ，时间设为 0。

⑧ END。

6. PCR 仪使用注意事项

(1) 软件维护

① 为防止计算机感染病毒，请用户指定配套计算机单机专用，以免造成软件功能障碍及实验数据丢失。

② 定期对实验数据进行保存和备份。

③ 定期突发事件文件夹目录下的文件为系统文件，不能删除。

④ 系统文件目录下的文件为系统文件，不能删除。

(2) 硬件维护

① PCR 仪为精密仪器，内部无用户可以维护的器件，忌擅自拆卸。

② 样品板的维护。请用户在使用过程中注意对 32 孔样品板的保养，防止污垢和灰尘进入 32 孔样品板孔中。若有需要，蘸取少许酒精棉签轻柔擦拭清洁样品板的孔内。

③ 不要堵住进风口，PCR 仪主机离其他竖直面至少 10 cm ，离其他热循环仪或产热的仪器更远些；不要让灰尘或纤维在进风口聚集，请确保空气足够的凉爽。

④ 不要并排放置两台或以上的 PCR 仪(或其他仪器)，以免排风口的热空气直接进入进风口。通过测量仪器进气口空气的温度来确保进入仪器的是 35°C 或以下的空气。

⑤ 为了避免在运行过程中操作人员触电的危险，PCR 仪主机三相电源输入端、接地端必须可靠地连接到大地上。

⑥ 正常的大气压(海拔高度应该低于 3000 m)；环境温度 $20\sim 35^{\circ}\text{C}$ ，典型使用温度 25°C ；相对湿度 $10\%\sim 80\%$ ；畅通流入的空气温度应在 35°C 或以下。

⑦ 避免仪器接受过多的热量和意外的溅入液体(不要将仪器放置在靠近热源的地方，如电暖炉，同时为防止电子元件的短路，应避免水或者其他液体溅在其中)。

三、称量及测量类仪器的使用及注意事项

(一) 天平

1. 天平的原理

电子天平实际上是测量地球对放在秤盘上的物体的引力即重力的仪器,它是利用电磁力平衡的原理进行设计的。天平空载时,电磁传感器处于平衡状态,加载后,感应线圈的位置发生改变,光电传感器中的光敏三极管所接收的光线强度改变,其输出电流也改变,该变化量经微处理器处理后,控制电磁线圈的电流大小,使电磁传感器重新处于平衡状态,同时,微处理器将电磁线圈的电流变化量转变为数字信号,在显示屏上显示出来。



图 1-0-6 电子天平

2. 使用步骤

- ① 清扫天平。
- ② 水平调节。已处于水平状态的,请勿移动天平。
- ③ 预热。天平右上角有“0”或左下角有“0”符号,表示天平处于关机或待机状态,学生不必等待预热时间。
- ④ 按“ON/OFF”键开启天平,进行自检。
- ⑤ (BP221S,DENVER-TB214)内校准。按“TARE”清零,再按“CAL/CF”进行内校准,至显示“0.0000”,校准完毕,如有必要,反复几次。
- ⑥ (BS210S)外校准。按“TARE”清零,再按“CAL”键,显示“CAL+200.0000”,将 200 g 标准砝码置于秤盘中央,显示“+200.0000 g”,取下砝码,显示为零。若必要,反复几次。
- ⑦ 进行称量与去皮称量。按“TARE”键清零,置被称容器于秤盘上,天平显示容器质量;按“TARE”键去皮量,天平显示零,将被称物小心加入容器中直至达到所需质量,所显示的值即为被称物的净质量。
- ⑧ 按“ON/OFF”键关闭显示器,清扫天平,罩好天平罩。

3. 注意事项

- ① 勿拔下天平电源插头。