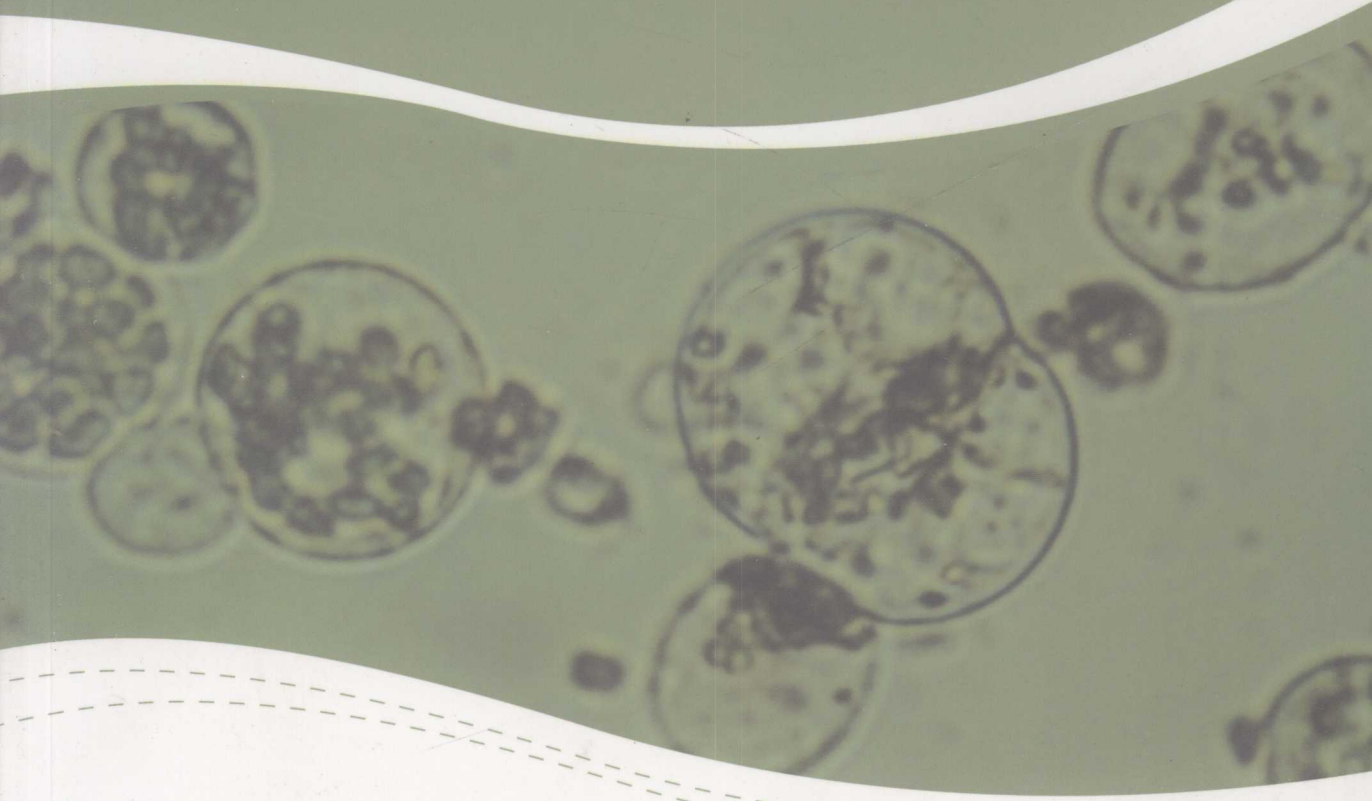


高等农林院校基础生物学系列实验教材

细胞工程 实验教程

主编 王晶珊 王爱华



高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS

高等农林院校基础生物学系列实验教材



00844468
南阳理工学院

Q81-33

2

细胞工程实验教程

Xibao Gongcheng Shiyān Jiāochéng

主任委员:刘永光

副主任委员:郭立忠

主 编 王晶珊 王爱华

副主编 王 然 张志芬 徐丽娟 王晓杰

编 者 (按姓氏笔画为序)

王 然	王晓杰	王爱华	王晶珊
乔利仙	孙世孟	张志芬	杨国锋
赵春梅	赵美爱	徐丽娟	郭宝太
盖树鹏	隋炯明	董晓颖	蔡春梅
樊连梅	薛仁镐	穆 平	



高等教育出版社·北京
HIGHER EDUCATION PRESS BEIJING

■ 内容提要

本书是根据农林院校生物类相关专业教学要求,在总结相关课程教学经验以及科研实践经验的基础上编写而成。内容包括植物细胞工程篇和动物细胞工程篇两大部分,设置了基础性实验、综合性实验和研究性实验三大类型,共 30 个实验。本书包含了不同层次水平的实验项目,以满足不同专业、不同学时数的实验教学需求。除基本实验外,还设置了多种植物材料不同类型器官组织培养的实验项目。

本书适于农林类高等院校生物类专业“细胞工程”、“组织培养”等课程的实验教学使用,也可供相关专业研究生、教师和科研人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

细胞工程实验教程/王晶珊,王爱华主编. —北京:
高等教育出版社,2011. 2

ISBN 978 - 7 - 04 - 031358 - 1

I. ①细… II. ①王…②王… III. ①细胞工程 - 实
验 - 高等学校 - 教材 IV. ①Q813 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 012788 号

策划编辑 吴雪梅 李光跃
封面设计 杨立新

责任编辑 高新景
责任印制 朱学忠

出版发行 高等教育出版社
社 址 北京市西城区德外大街 4 号
邮政编码 100120

经 销 蓝色畅想图书发行有限公司
印 刷 涿州市京南印刷厂

购书热线 010 - 58581118
咨询电话 400 - 810 - 0598
网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.landaco.com>
<http://www.landaco.com.cn>
畅想教育 <http://www.widedu.com>

开 本 787 × 1092 1/16
印 张 6.5
字 数 160 000

版 次 2011 年 2 月第 1 版
印 次 2011 年 2 月第 1 次印刷
定 价 11.50 元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 31358-00

► 前言

细胞工程是现代生物技术的重要组成部分,它是在细胞、组织和器官水平上对生物进行遗传改良、生长发育调控、快速繁殖或进行特殊产物生产的重要技术。21 世纪随着生物技术的迅猛发展,细胞工程已经成为生物类专业本科生的重要课程之一。

细胞工程也是一门实验性很强的学科。目前细胞工程实验教材很少,尤其适用农林院校细胞工程实验教学的更是缺乏。在此种情况下,我们在多年教学的基础上,结合自身的科学研究经验和成果,吸收本学科领域的最新研究进展编写了《细胞工程实验教程》。本书共设计 30 个实验,除基础性实验外,还包括了综合性实验和研究性实验,以培养学生的实践能力和创新能力。每个实验都系统、详细地介绍了实验目的、实验原理、实验步骤和应注意的问题,并附有思考题。

前言、实验 5、9、10、12、15、22、23、25 由王晶珊、孙世孟、樊连梅编写;实验 1、2、3 由徐丽娟、杨国锋编写;实验 4、6、7、11、13、14 由张志芬、隋炯明、赵春梅编写;实验 8、16、18 由王然编写;实验 17 由董晓颖编写;实验 19、21、26、27、28、29、30 由王爱华、赵美爱、蔡春梅编写;实验 20、24 由王晓杰、郭宝太编写。其他参编人员还有薛仁镐、穆平、盖树鹏、乔利仙。全书由王晶珊和王爱华统稿和定稿。

王晶珊 王爱华
2010 年 10 月

郑 重 声 明

高等教育出版社依法对本书享有专有出版权。任何未经许可的复制、销售行为均违反《中华人民共和国著作权法》，其行为人将承担相应的民事责任和行政责任，构成犯罪的，将被依法追究刑事责任。为了维护市场秩序，保护读者的合法权益，避免读者误用盗版书造成不良后果，我社将配合行政执法部门和司法机关对违法犯罪的单位和个人给予严厉打击。社会各界人士如发现上述侵权行为，希望及时举报，本社将奖励举报有功人员。

反盗版举报电话：(010)58581897/58581896/58581879

反盗版举报传真：(010)82086060

E - mail: dd@ hep. com. cn

通信地址：北京市西城区德外大街4号

高等教育出版社打击盗版办公室

邮 编：100120

购书请拨打电话：(010)58581118

目 录

第一篇 植物细胞工程

实验 1	培养基母液的配制	2
实验 2	培养基的配制与灭菌	6
实验 3	培养材料的消毒与无菌操作	9
实验 4	试管苗的驯化移栽	12
实验 5	甘薯茎尖的剥取与培养	15
实验 6	草莓茎尖培养与脱毒苗生产	20
实验 7	山药茎尖培养	22
实验 8	苹果茎尖培养及快速繁殖	24
实验 9	驱蚊草离体培养及快速繁殖	26
实验 10	大花惠兰组织培养及快速繁殖	29
实验 11	蝴蝶兰花梗腋芽组织培养及快速繁殖	32
实验 12	丽格海棠叶片、叶柄组织培养及快速繁殖	34
实验 13	大花萱草花梗组织培养及快速繁殖	36
实验 14	非洲菊花托组织培养及快速繁殖	39
实验 15	百合鳞片离体培养及快速繁殖	42
实验 16	胚的离体培养	44
实验 17	子房、胚珠的离体培养	46
实验 18	花药、花粉的离体培养	48
实验 19	人工种子的制作	51
实验 20	微型变态器官的诱导 ——马铃薯试管薯的诱导	54
实验 21	植物细胞的悬浮培养	57
实验 22	植物原生质体的分离与培养	60
实验 23	原生质体融合与培养	64

实验 24	植物离体诱变及突变体的筛选 ——花生胚小叶离体诱变与耐盐突变体的筛选	70
实验 25	植物材料的超低温保存	74

第二篇 动物细胞工程

实验 26	细胞培养液的配制	78
实验 27	原代细胞的培养	80
实验 28	细胞的传代培养	83
实验 29	细胞的冻存和复苏	85
实验 30	动物细胞融合	87
附录		89
参考文献		95

第一篇

植物细胞工程

实验 I

培养基母液的配制

一、实验目的

通过对 MS 培养基母液的配制,学习掌握培养基母液的配制方法。

二、实验原理

在配制培养基时,为了取用方便和用量准确,往往先把各组分按其用量配成扩大一定倍数的浓缩液,即母液,贮存备用,用时稀释。配制母液时,一般按药品的种类和性质分别配制,单独保存或几种混合保存。例如,把所有大量元素一起配成大量元素母液,同理配成微量元素母液,以及植物激素母液等。母液扩大的倍数主要取决于用量的多少,用量大的扩大的倍数宜低,反之则高,但要注意过高浓度和不恰当的混合会引起沉淀,影响培养效果。

三、实验用品

1. 仪器和试剂

电子天平(1/1 000、1/10 000),磁力加热搅拌器,烧杯(100、500、1 000 ml),量筒(100、500、1 000 ml),容量瓶(100、500、1 000 ml),试剂瓶(100、500、1 000 ml),药匙,称量纸等。

2. 培养基

药品按培养基配方准备(表 1-1),激素按需要准备。

表 1-1 MS 培养基母液的配置

成分	培养基配方 用量/(ml/L)	每升母液 用量/mg	母液扩 大倍数	每升培养 基用量/ml
大量元素(母液 I)				
KNO ₃	1 900	19 000	10	100
NH ₄ NO ₃	1 650	16 500		
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	3 700		
KH ₂ PO ₄	170	1 700		
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	4 400		

续表

成分	培养基配方 用量/(ml/L)	每升母液 用量/mg	母液扩 大倍数	每升培养 基用量/ml
微量元素(母液Ⅱ)				
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	2 230	100	10
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	860		
H ₃ BO ₃	6.2	620		
KI	0.83	83		
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	25		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	2.5		
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	2.5		
有机成分(母液Ⅲ)				
甘氨酸	2	200	100	10
盐酸硫氨酸	0.4	40		
盐酸吡哆素	0.5	50		
烟酸	0.5	50		
肌醇	100	10 000		
铁盐(母液Ⅳ)				
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.85	2 785	100	10
Na ₂ -EDTA·2H ₂ O	37.25	3 725		

四、实验步骤

1. MS 大量元素母液的配制

因大量元素用量大,为避免过高浓度的混合液会发生沉淀,一般配成 10 倍的母液。根据所选 MS 培养基配方,按大量元素在表 1-1 中排列顺序,按其 10 倍用量,用 1/1 000 天平逐个称出,依次加入盛有 2/3 量蒸馏水的烧杯中,于磁力搅拌器上搅拌。注意每种试剂溶解后,再加下一种。原则上应把 Ca²⁺ 与 SO₄²⁻、PO₄³⁻ 分开,以免产生沉淀,最后加蒸馏水定容至刻度,此即 MS 大量元素母液。装入试剂瓶,贴上标签,注明名称、扩大倍数、配制日期,置入 4℃ 冰箱中保存。配培养基时,每配 1 000 ml 培养基,母液用量为 100 ml。

2. MS 微量元素母液的配制

微量元素因用量小,为称量方便及精确,常配成 100 倍或 1 000 倍的母液,即将每一种微量元素化合物的量扩大 100 倍或 1 000 倍,分别称量、溶解、定容、保存,方法同上。配制 1 000 ml 培养基,取母液 10 ml 或 1 ml。本实验配成 100 倍母液。

3. 铁盐母液的配制

目前常用的铁盐为 FeSO₄·7H₂O 和 Na₂-EDTA 的螯合物。这种螯合物比较稳定,不

易沉淀,但必须单独配制。常配成 100 倍的母液。按 100 倍量称取 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 加入盛有 2/3 量蒸馏水的烧杯中, 在 $90\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴锅中加热, 直至颜色呈黄色并变深, 使其充分螯合。冷却后定容, 装入棕色试剂瓶, 贴上标签, 注明名称、扩大倍数、配制日期。注意铁盐母液配制后, 若立即存放冰箱中, 会有结晶析出, 因此须在常温下放置一段时间, 使其充分反应, 再置入 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存。每配制 1 000 ml 培养基, 取 10 ml 母液。

4. MS 有机化合物母液的配制

主要指维生素及氨基酸类物质配成 100 倍母液。按 100 倍量分别称量、定容、保存, 方法同上。配 1 000 ml 培养基, 取母液 10 ml。

5. 植物激素母液的配制

各种激素分别用 1/10 000 的电子天平称量, 容量瓶定容, 通常配成 1 mg/ml 或 0.1 mg/ml 浓度的单一母液。配制培养基时, 根据不同的配方要求分别加入所需的量。最常用的植物激素有:

(1) 生长素: 2,4 - 二氯苯氧乙酸 (2,4 - D)、萘乙酸 (NAA)、吲哚乙酸 (IAA)、吲哚丁酸 (IBA) 等。配制时, 先按要求称取用量, 置于 100 ml 小烧杯中, 慢慢滴加少许 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液, 并不断搅拌, 直至溶解, 再用蒸馏水定容至所需浓度。

(2) 细胞分裂素: 玉米素 (ZT)、6 - 苄氨基嘌呤 (BAP)、激动素 (KT)、异戊烯基腺嘌呤 (2 - iP)。配制时, 先按要求称取用量, 置于 100 ml 小烧杯中, 慢慢滴加少许 0.1 mol/L 的 HCl 溶液, 并不断搅拌, 直至溶解, 再用蒸馏水定容至所需浓度。

(3) 赤霉素类: 赤霉素 (GA_3) 配制时先滴加少量 95 % 酒精溶解, 再加蒸馏水定容至所需浓度, 因赤霉素加热易分解, 需过滤灭菌。

(4) 脱落酸: 脱落酸 (ABA) 配制时先滴加少量 95 % 酒精溶解, 再加蒸馏水定容至所需浓度, 因脱落酸加热易分解, 需过滤灭菌。

将以上各种激素母液分别装入棕色试剂瓶中, 贴好标签, 注明母液名称、倍数 (或浓度)、日期, 放入 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存。

各种母液在冰箱中通常可保存几周, 如出现浑浊或沉淀以及微生物污染, 则不宜再用。

五、注意事项

脱落酸配制时, 由于光照射下 (尤其是紫外光), 2 - 顺式脱落酸易转变为 2 - 反式脱落酸, 从而降低生理活性, 所以配制时最好在弱光下进行。

六、思考与记录

1. 在母液的配制、贮存及使用中应注意哪些问题?
2. 根据下表中各母液的倍数 (或浓度), 计算配制不同体积的 $\text{MS} + \text{NAA } 0.2\text{ mg/L} + \text{BAP } 2\text{ mg/L}$ 培养基所需吸取母液的量, 并将结果填入下表:

试剂名称	母液倍数 (或浓度)	配制 1 000 ml 培养基所需量/ml	配制 500 ml 培养基所需量/ml	配制 200 ml 培养基所需量/ml
MS 大量母液	10 ×			
MS 微量母液	100 ×			
MS 铁盐母液	50 ×			
MS 有机母液	100 ×			
NAA 母液	1 mg/ml			
BAP 母液	1 mg/ml			

在完成 MS 培养基配制的过程中,应特别注意以下几点:①配制培养基时,应严格按照配方称取各种成分,加入烧杯中充分混匀(根据实际需要,个别培养基还需添加植物生长调节剂或其他成分),其他步骤同上。②贴标签:注明培养基种类、配制日期。③灭菌:对于热不稳定的激素,要过滤灭菌,再添加到已灭菌的培养基中,充分混匀。④分装:分装时,培养基应冷却至 50℃ 左右,再分装到培养基瓶或瓶口上,以免造成污染。⑤封口:培养基分装后,应立即封口,以免水分蒸发和污染。⑥标记:培养基瓶上应贴有标签,注明培养基种类、配制日期。

在配制培养基时,应注意以下几点:①配制培养基时,应严格按照配方称取各种成分,加入烧杯中充分混匀(根据实际需要,个别培养基还需添加植物生长调节剂或其他成分),其他步骤同上。②贴标签:注明培养基种类、配制日期。③灭菌:对于热不稳定的激素,要过滤灭菌,再添加到已灭菌的培养基中,充分混匀。④分装:分装时,培养基应冷却至 50℃ 左右,再分装到培养基瓶或瓶口上,以免造成污染。⑤封口:培养基分装后,应立即封口,以免水分蒸发和污染。⑥标记:培养基瓶上应贴有标签,注明培养基种类、配制日期。

在配制培养基时,应注意以下几点:①配制培养基时,应严格按照配方称取各种成分,加入烧杯中充分混匀(根据实际需要,个别培养基还需添加植物生长调节剂或其他成分),其他步骤同上。②贴标签:注明培养基种类、配制日期。③灭菌:对于热不稳定的激素,要过滤灭菌,再添加到已灭菌的培养基中,充分混匀。④分装:分装时,培养基应冷却至 50℃ 左右,再分装到培养基瓶或瓶口上,以免造成污染。⑤封口:培养基分装后,应立即封口,以免水分蒸发和污染。⑥标记:培养基瓶上应贴有标签,注明培养基种类、配制日期。

在配制培养基时,应注意以下几点:①配制培养基时,应严格按照配方称取各种成分,加入烧杯中充分混匀(根据实际需要,个别培养基还需添加植物生长调节剂或其他成分),其他步骤同上。②贴标签:注明培养基种类、配制日期。③灭菌:对于热不稳定的激素,要过滤灭菌,再添加到已灭菌的培养基中,充分混匀。④分装:分装时,培养基应冷却至 50℃ 左右,再分装到培养基瓶或瓶口上,以免造成污染。⑤封口:培养基分装后,应立即封口,以免水分蒸发和污染。⑥标记:培养基瓶上应贴有标签,注明培养基种类、配制日期。

在配制培养基时,应注意以下几点:①配制培养基时,应严格按照配方称取各种成分,加入烧杯中充分混匀(根据实际需要,个别培养基还需添加植物生长调节剂或其他成分),其他步骤同上。②贴标签:注明培养基种类、配制日期。③灭菌:对于热不稳定的激素,要过滤灭菌,再添加到已灭菌的培养基中,充分混匀。④分装:分装时,培养基应冷却至 50℃ 左右,再分装到培养基瓶或瓶口上,以免造成污染。⑤封口:培养基分装后,应立即封口,以免水分蒸发和污染。⑥标记:培养基瓶上应贴有标签,注明培养基种类、配制日期。

在配制培养基时,应注意以下几点:①配制培养基时,应严格按照配方称取各种成分,加入烧杯中充分混匀(根据实际需要,个别培养基还需添加植物生长调节剂或其他成分),其他步骤同上。②贴标签:注明培养基种类、配制日期。③灭菌:对于热不稳定的激素,要过滤灭菌,再添加到已灭菌的培养基中,充分混匀。④分装:分装时,培养基应冷却至 50℃ 左右,再分装到培养基瓶或瓶口上,以免造成污染。⑤封口:培养基分装后,应立即封口,以免水分蒸发和污染。⑥标记:培养基瓶上应贴有标签,注明培养基种类、配制日期。

实验 2

培养基的配制与灭菌

一、实验目的

以 MS 培养基为例,熟悉培养基配制与灭菌的操作方法。

二、实验原理

培养基含有植物细胞或组织生长所需要的各种营养物质,同时也是细菌和真菌等微生物滋生繁殖的好场所。微生物在培养基中往往比植物细胞生长更为迅速,并且产生毒素,可致植物细胞死亡。因此,培养基配制好后需及时灭菌,以保证实验的顺利进行。

三、实验用品

1. 仪器和试剂

托盘天平,磁力加热搅拌器,酸度计或 pH 试纸(5.0 ~ 7.0),高压蒸汽灭菌锅,烧杯(500、1 000 ml),量筒(1 000、500、100 ml),移液枪或移液管(10、1、0.1 ml),吸耳球,药匙,称量纸,培养瓶或 100 ml 三角瓶,封口膜,蔗糖,琼脂,活性炭,0.1 mol/L NaOH,1 mol/L NaOH,0.1 mol/L HCl 等。

2. 培养基

MS 培养基母液,实验所需各种激素母液。

四、实验步骤

(一) 培养基的配制

每组按照后期实验内容需求,分别配制各种类型的培养基各 500 ml:MS 固体培养基;MS 添加激素的各种培养基。

1. MS 固体培养基的配制

(1) 用实验 1 配制的母液,计算好各种母液的用量。取 500 ml 烧杯一只,加入约 300 ml 蒸馏水,置磁力加热搅拌器上,然后用不同规格的移液枪或移液管依次加入大量元素、微量元素、铁盐、有机物母液,充分搅匀。

(2) 用托盘天平称取 15 g 蔗糖,加入烧杯中,搅拌溶解后,用量筒定容至 500 ml。

(3) 用 0.1、1 mol/L NaOH 和 0.1 mol/L HCl 将 pH 调至 5.8。

(4) 加入4 g 琼脂粉,微波炉溶化。

注意:琼脂溶化一定要彻底,否则分装后培养基软硬不匀。

(5) 分装:培养基做好后应立即分装,以免冷却凝固。每瓶分装的培养基约占瓶容量的1/4为宜。

(6) 封口:用瓶盖或封口膜等封口。培养基分装后要立即封口,以免水分蒸发和污染,然后贴上标签,注明培养基种类、配制日期。

注意:分装时不要把培养基粘到瓶壁或瓶口上,以免造成污染。

2. MS 添加激素的各种培养基的配制

在完成MS培养基配制的第一步后,再按所需激素种类和用量,用移液枪或移液管分别吸取各种激素母液,加入烧杯充分混匀(根据实验需要,个别培养基还需添加活性炭等其他成分),其他步骤同上。贴上标签,注明培养基种类、配制日期。

注意:对于遇热不稳定的激素,要过滤灭菌,再添加到已灭菌的培养基中,充分摇匀后分装。

(二) 培养基的灭菌

1. 高压蒸汽灭菌

培养基及器具等适合用高压蒸汽灭菌。以手提式高压蒸汽灭菌锅为例,具体操作如下:

(1) 打开灭菌锅盖,向外层锅内加水至与锅炉底的支架平齐。

(2) 将待灭菌的培养基、蒸馏水及其他需灭菌的物品(器具用纸包装)放入灭菌锅的铝桶内,最好装完后在上面放几层牛皮纸或纱布、毛巾等,防止水蒸汽从锅顶冷凝滴下打湿器皿包装纸。然后盖好锅盖,并将盖上的排气软管插入桶壁的槽内,按相对方向拧紧螺丝,使锅密闭,接通电源。

(3) 先关闭放气阀加热,待压力上升到0.05 MPa时,打开放气阀,排净锅内冷空气,待压力表指针恢复到零位后,再关闭放气阀,如此反复排气2次。关闭阀门加热,待压力上升到0.1 MPa(温度为121℃)时开始计时,用通电、断电来保持该压力20 min,即达到灭菌目的。

(4) 切断热源,并缓慢放出蒸汽,待压力降至零时,才能打开锅盖,取出灭菌物品。培养瓶盖因加热松动,要再次扭紧。若培养基中添加了活性炭等易沉淀物质,需待冷却片刻后,轻摇培养基,使其混匀,再冷凝。

2. 干热灭菌

适用于培养皿、试管、移液管等玻璃器皿及各种用具的灭菌。

(1) 首先把玻璃器皿或用具洗涤干净,蒸馏水冲洗,装入金属灭菌筒或盒内,金属筒盖上的气孔应与筒体的气孔对齐,以利排气,置入烘箱中,接通电源,开始加热。

(2) 当温度达到160℃开始计时,通常采用160~180℃持续加热90 min来灭菌。灭菌完毕,待冷却后取出,并将排气孔错开封闭,备用。

3. 过滤灭菌

适用于高温高压下不稳定的植物生长调节物质、维生素、抗生素、酶溶液等的灭菌。具体操作如下:

(1) 选择孔径在0.25 μm以下的滤膜,放于过滤器中,用铝箔纸包好,注射器(溶液量

大用抽滤器)、三角瓶等也用铝箔或包装纸包好,高压蒸汽灭菌 20 min。

(2) 在超净工作台上,按无菌操作要求,打开包装,将待过滤溶液吸入注射器中,注射器头上安装已高压灭菌的过滤器。挤压注射器,使溶液经过过滤器滤膜,杂菌等留在滤膜之上,滤液滴入灭菌的三角瓶中,封口保存。

过滤灭菌的激素在配制培养基时添加,先将培养基放于烧杯中高压灭菌,烧杯中放一转子。在培养基凝固前(约 40 ~ 50 ℃),将激素按需要量加入到已灭菌的培养基中,磁力搅拌器搅匀,分装,封口。以上过滤灭菌操作在超净工作台内进行。

五、注意事项

1. 高压蒸汽灭菌注意事项

(1) 锅内冷空气必须排尽,否则压力表指针虽达到一定压力,但由于锅内冷空气的存在并未达到应有的温度而影响灭菌效果。

(2) 由于容器的体积不同,瓶壁的厚度不同,所以灭菌的时间应适当调整,对高压灭菌后不会变质的物品,如无菌水、栽培介质、接种用具等可延长灭菌时间或提高灭菌压力;而对培养基灭菌既要保证灭菌彻底,又要防止培养基中成分变质或效力降低,因此必须严格遵守时间。随容器大小而变化的培养基灭菌时间可参考表 2-1,但还要考虑锅内总物品的多少。如果容器大,但数量很少,仍可减少时间。

(3) 三角瓶中的液体不应超过总体积的 70 %,否则容易膨胀溢出。

(4) 在切断热源,放气时应注意,不要使压力降低太快,否则会引起激烈的减压沸腾,使容器中的液体溢出,培养基粘污瓶塞、瓶口等造成污染。一定注意,待气压降至零时才能开盖,否则危险。

2. 干热灭菌注意事项

烘箱内一次不应放置物品过多,以防热气循环不良或穿透慢,影响灭菌效果。灭菌后需等烘箱降温后再取出物品,过早打开会造成玻璃器皿炸裂,同时外部冷气进入箱内,可能会造成污染。

表 2-1 培养基高压蒸汽灭菌所需要的最少时间(Biondi 和 Thorp, 1981)

容器的体积/ml	在 121 ℃ 下灭菌所需要的最少时间/min
20 ~ 50	15
75 ~ 150	20
250 ~ 500	25
1 000	30
1 500	35
2 000	40

六、思考题

使用高压蒸汽灭菌锅应注意哪些问题?

实验 3

培养材料的消毒与无菌操作

一、实验目的

培养材料的消毒与无菌操作是组织培养中一个很重要的环节。通过实验,初步掌握材料消毒、接种的方法和技术。

二、实验原理

初次接种的材料,表面都带有各种微生物,必须在接种前对其进行消毒。消毒的基本原则是既要把材料表面附着的微生物杀死,又不伤害材料内部的组织、细胞。因此,消毒所采用药剂的种类、浓度、处理时间的长短,均应根据材料的种类、组织的老嫩、茸毛的有无及材料对药剂的敏感性来定。

三、实验用品

1. 实验材料

作物、果树、蔬菜、花卉等植物的茎尖,带腋芽的嫩茎及嫩叶等。

2. 仪器和试剂

超净工作台,镊子,手术刀,剪刀,酒精灯,棉球,火柴,烧杯,废液缸,培养皿(无菌),无菌滤纸,解剖镜、0.1%升汞(或2%次氯酸钠),70%酒精,无菌水等。

3. 培养基

根据不同植物器官组织材料选用基本培养基,并根据需求添加不同种类浓度和配比的植物激素。

四、实验步骤

(一) 接种前的准备

1. 培养基的准备

按培养材料的要求,选取实验2配制的各种培养基,待用。

2. 超净工作台的准备

(1) 在超净工作台上摆好酒精灯、70%酒精棉球瓶、无菌培养皿、无菌滤纸、镊子、手术刀、火柴、0.1%升汞(或2%次氯酸钠)、70%酒精、无菌水、培养基等。

(2) 无菌室(包括缓冲间)紫外灯灭菌 15 ~ 20 min。超净工作台开机过滤空气并开紫外灯 15 ~ 20 min,然后关掉紫外灯,用 70 % 酒精喷雾降尘。

3. 培养材料的准备

从田间或温室选取生长旺盛无病虫害的顶芽、幼嫩叶片和嫩茎段(去掉老叶,剪成合适的长度),放入烧杯中;自来水反复漂洗干净(可适当加几滴洗涤剂漂洗),备用。

(二) 培养材料的消毒

1. 操作前先用肥皂洗手,再用 70 % 酒精棉球将手(特别是指尖)、手臂、工作台面及放入台面上的所有操作用具、器皿等都擦一遍,以清除尘粒。点燃酒精灯,把操作的器械(镊子、手术刀等)放在酒精灯上灼烧灭菌,之后放在支架上冷却待用。

2. 将材料先倒入 70 % 酒精浸泡,摇动几下,10 ~ 20 s 后立即倒出酒精,加无菌水漂洗,然后倒入 0.1 % 升汞(或 2 % 次氯酸钠)进行表面消毒,时间的长短视材料而定,一般是 5 ~ 12 min 或更长(常用消毒剂及消毒时间见表 3-1)。药剂浸泡过程中应不断摇动,然后用无菌水冲洗 3 ~ 5 遍,备用。

3. 对于果树或木本花卉未萌动或刚刚萌动的芽,一般可进行两次灭菌。即在上述过程完成后,进行鳞片及幼叶剥离,然后再进行第二次消毒,此次消毒时间宜短,用无菌水冲洗 3 ~ 5 遍后剥取茎尖接种。

表 3-1 常用消毒剂及消毒时间

消毒剂	使用质量 分数/%	去除难易	消毒时间/min	消毒效果	是否毒害 植物
次氯酸钙	9 ~ 10	易	5 ~ 30	很好	低毒
次氯酸钠	2	易	5 ~ 30	很好	无
过氧化氢	10 ~ 12	最易	5 ~ 15	好	无
硝酸银	1	较难	5 ~ 30	好	低毒
氯化汞	0.1 ~ 1	较难	2 ~ 10	最好	剧毒
酒精	70 ~ 75	易	0.2 ~ 2	好	有
抗生素	4 ~ 50(mg/L)	中	30 ~ 60	较好	低毒

(三) 无菌接种

经消毒后的材料,必须在无菌条件下接种到培养基中,进行无菌培养。具体操作如下:

1. 培养基按成分不同分类摆放在工作台边上。注意不要挡住无菌风。

2. 轻轻打开瓶盖,将瓶口迅速在酒精灯火焰上方转动一圈灼烧灭菌,然后放在工作台上。

3. 用镊子取出待接种材料置于垫有无菌滤纸的培养皿内,进行材料的剥离和切割。

(1) 茎段 一般切成带一个芽(芽最好位于中央)的茎段,两端切掉被消毒剂杀伤的切口,接种到所选培养基上,腋芽要露在培养基之上,且不要倒置。每瓶接种 3 ~ 4 个茎段。再将瓶口和瓶盖在火焰上方迅速旋转灼烧灭菌,盖紧瓶盖或封口膜,注明名称、接种日期。