



## 数字课程网站

网址：<http://abook.hep.com.cn/48457>

<http://abook.hep.edu.cn/48457>

数字课程账号 使用说明详见书内数字课程说明页

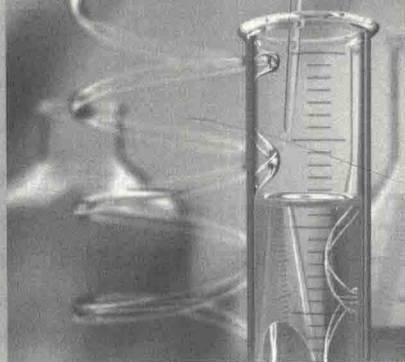
ISBN 978-7-04-048457-1



9 787040 484571 >

定价 15.00 元

全国高等学校“十三五”农林规划教材  
生物学实践教学改革系列教材



# 细胞工程实验

主 编 王爱华 徐丽娟

副主编 彭光霖 王 然 王晓杰 李 玲

编 者 （按姓氏拼音排序）

蔡春梅 董晓颖 樊连梅 盖树鹏

郭宝太 李 玲 彭光霖 乔利仙

隋炯明 孙世孟 王 然 王爱华

王晓杰 徐丽娟 薛仁镐 杨国锋

赵春梅 赵美爱

主 审 王晶珊

高等教育出版社·北京

## 内容提要

本书是根据高等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。为了提高实验学习效果,针对一些实验项目添加了彩图、教学视频等数字化资源,大大提高了教材的实用性,读者可登录本书配套数字课程详细查看。

本书适于高等农林院校生物类专业“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 / 王爱华, 徐丽娟主编. -- 北京: 高等教育出版社, 2017.9

ISBN 978-7-04-048457-1

I. ①细… II. ①王… ②徐… III. ①细胞工程-实验-农业院校-教材 IV. ①Q813-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 205229 号

Xibao Gongcheng Shiyan

策划编辑 孟 丽      责任编辑 孟 丽      封面设计 张志奇      责任印制 韩 刚

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  
印 刷 河北省财政厅票证文印中心  
开 本 850mm×1168mm 1/16  
印 张 6.75  
字 数 150 千字  
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.hepmall.com.cn>  
<http://www.hepmall.com>  
<http://www.hepmall.cn>  
版 次 2017 年 9 月第 1 版  
印 次 2017 年 9 月第 1 次印刷  
定 价 15.00 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 48457-00

数字课程 (基础版)

# 细胞工程实验

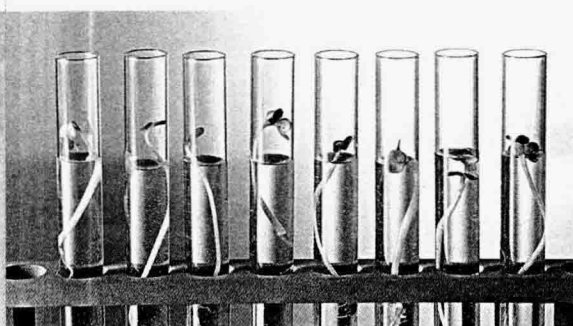
主编 王爱华 徐丽娟

## 登录方法:

1. 电脑访问 <http://abook.hep.com.cn/48457>, 或手机扫描下方二维码、下载并安装 Abook 应用。
2. 注册并登录, 进入“我的课程”。
3. 输入封底数字课程账号 (20 位密码, 刮开涂层可见), 或通过 Abook 应用扫描封底数字课程账号二维码, 完成课程绑定。
4. 点击“进入学习”, 开始本数字课程的学习。

课程绑定后一年为数字课程使用有效期。如有使用问题, 请发邮件至:

[lifescience@pub.hep.cn](mailto:lifescience@pub.hep.cn)



## 细胞工程实验

细胞工程实验数字课程与纸质教材配套使用, 是纸质教材的拓展和补充。数字课程内容与纸质教材对应, 有 28 个实验操作的视频、部分实验结果、彩色图片等, 以方便广大教师教学和学生学习。

用户名:  密码:  验证码:  **5360** 忘记密码?

<http://abook.hep.com.cn/48457>

扫描二维码, 下载 Abook 应用



# “细胞工程实验”数字课程编委会

(按姓氏拼音排序)

李 玲 牛婷婷 王爱华 王晶珊

徐丽娟 袁振宁 张艳萍 朱少叶

## ► 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，目前适用于农林院校细胞工程实验教学的教材较少。编者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本《细胞工程实验》。全书共设计 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，以培养学生的实验实践能力和创新能力。

本书由青岛农业大学和中国农业大学烟台研究院富有教学经验的骨干教师共同编写而成，具体分工如下：前言，实验 5、9、10、12、15、22、23、25 由李玲、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 由彭光霖、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。全书由王晶珊教授主审。其他参编人员还有薛仁镐、樊连梅、盖树鹏、乔利仙。网络信息技术的日益普及，为学生实验技能的培养提供了良好的平台，与本教材配套的数字课程与教材一体化设计，内容包括 28 个教学视频和部分实验结果彩色照片等资源，便于学生在动手操作之前作为预习参考，也可供因受学时限制等原因未开设该实验项目的学生自学。视频脚本的编撰主要由王爱华、徐丽娟、李玲和王晶珊老师完成，由青岛农业大学袁振宁老师担任摄像，朱婷婷、朱少叶担任视频编辑，张艳萍担任视频解说。

限于编者对细胞工程实验的认识水平，书中不当之处在所难免，敬请读者和各位同仁予以批评指正。

编者

2017 年 4 月

# 目 录

## 第一篇 植物细胞工程

实验 1	培养基母液的配制 .....	3
实验 2	培养基的配制与灭菌 .....	7
实验 3	培养材料的消毒与无菌操作 .....	10
实验 4	试管苗的驯化移栽 .....	13
实验 5	甘薯茎尖的剥取与培养 .....	16
实验 6	草莓茎尖培养与脱毒苗生产 .....	21
实验 7	山药茎尖培养 .....	23
实验 8	苹果茎尖培养及快速繁殖 .....	25
实验 9	驱蚊草离体培养及快速繁殖 .....	27
实验 10	大花惠兰组织培养及快速繁殖 .....	30
实验 11	蝴蝶兰花梗腋芽组织培养及快速繁殖 .....	33
实验 12	丽格海棠叶片、叶柄组织培养及快速繁殖 .....	35
实验 13	大花萱草花梗组织培养及快速繁殖 .....	37
实验 14	非洲菊花托组织培养及快速繁殖 .....	40
实验 15	百合鳞片离体培养及快速繁殖 .....	43
实验 16	胚的离体培养 .....	45
实验 17	子房、胚珠的离体培养 .....	47
实验 18	花药、花粉的离体培养 .....	49
实验 19	人工种子的制作 .....	52
实验 20	微型变态器官(马铃薯试管薯)的诱导 .....	55
实验 21	植物细胞的悬浮培养 .....	58
实验 22	植物原生质体的分离与培养 .....	61
实验 23	原生质体融合与培养 .....	65

实验 24	植物离体诱变及突变体的筛选 .....	71
实验 25	植物材料的超低温保存 .....	75

## 第二篇 动物细胞工程

实验 26	细胞培养液(基)的配制 .....	81
实验 27	原代细胞的培养 .....	83
实验 28	细胞的传代培养 .....	85
实验 29	细胞的冻存和复苏 .....	87
实验 30	动物细胞融合 .....	89
附录	.....	91
主要参考文献	.....	98



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. 主要仪器和试剂

电子天平（1/1 000、1/10 000）、磁力加热搅拌器、冰箱、烧杯（100 mL）、量筒（100 mL）、容量瓶（100 mL）、试剂瓶（100 mL）、药匙、称量纸、标签等。

#### 2. 培养基

药品按培养基配方准备（表 1-1），激素按需要准备。

● 视频 1-1  
电子天平的使用  
方法

成分	培养基配方 用量 / ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	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）			10	100
$\text{KNO}_3$	1 900	19 000		
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1 650	16 500		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	3 700		
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	1 700		
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	4 400		
微量元素（母液 II）			100	10
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3	2 230		
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	860		

· 表 1-1 MS 培养基母液的配制

续表

成分	培养基配方 用量 / (mg · L <sup>-1</sup> )	每升母液 用量 /mg	母液扩大 倍数	每升培养基 用量 /mL
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	620		
KI	0.83	83		
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.25	25		
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.025	2.5		
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.025	2.5		
有机成分 (母液Ⅲ)			100	10
甘氨酸	2	200		
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)			100	10
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27.85	2 785		
Na <sub>2</sub> -EDTA · 2H <sub>2</sub> 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。原则上应把带 Ca<sup>2+</sup> 溶液与带 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>、PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>、Mg<sup>2+</sup> 溶液分开, 以免产生沉淀, 最后加蒸馏水, 用容量瓶定容至刻度, 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。

##### 3. MS 铁盐母液的配制

目前常用的铁盐为 FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 和 Na<sub>2</sub>-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 FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 和 Na<sub>2</sub>-EDTA, 加入盛有 2/3 量蒸馏水的烧杯中, 在 90℃ 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

视频 1-2  
MS 大量元素母液  
的配制

视频 1-3  
铁盐母液的配制

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℃冰箱中保存。每配制1 000 mL培养基，取10 mL母液。

彩图 1-1  
铁盐母液

#### 4. MS 有机化合物母液的配制

主要指将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 如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，高压灭菌。

视频 1-4  
萘乙酸母液的  
配制

(2) 细胞分裂素 如玉米素(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，高压灭菌。

(3) 赤霉素类 赤霉素(GA<sub>3</sub>)配制时先滴加少量95%乙醇溶解，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%乙醇溶解，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℃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

1. 称量要精确。
2. 配制母液时要注意药品溶解的先后顺序，以免发生化学反应，以使其产生沉淀。
3. 脱落酸配制时，由于光照射下(尤其是紫外线)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(或含量)，计算配制不同体积的MS+NAA 0.2 mg/L+BAP 2 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 大量元素母液	10 ×			
MS 微量元素母液	100 ×			
MS 铁盐母液	50 ×			
MS 有机成分母液	100 ×			
NAA 母液	1 mg/mL			
BAP 母液	1 mg/mL			

## 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. 主要仪器和试剂

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 (1 000、500 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。

● 视频 2-1  
酸度计的使用方法

#### 2. 培养基

MS 培养基母液,实验所需各种激素母液。

● 视频 2-2  
移液枪的使用方法

### 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,计算出各种母液的用量。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。

● 视频 2-3  
MS 培养基的配制

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

(3) 用 0.1 mol/L、1 mol/L NaOH 和 0.1 mol/L HCl 调 pH 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、配制时间。

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, 防止水蒸气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, 并缓慢放出水蒸气, 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,

视频 2-4  
高压灭菌锅的  
使用方法

视频 2-5  
过滤灭菌操作



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（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。以上过滤灭菌操作需在超净工作台内进行。

● 视频 2-6  
添加高温分解成分培养基的配制

## 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，所以灭菌的时间应当适当调整，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，培养基玷污瓶塞、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。

(5) 开盖后应尽快转移培养瓶，使培养瓶冷却、凝固，最好储藏于 4~10℃ 的条件下。

### 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。

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

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

## 六、思考题

使用高压蒸汽灭菌锅应注意哪些问题？