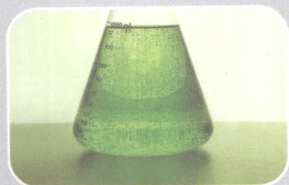


普通高等教育“十一五”规划教材

生物工程·生物技术

综合实验

夏海武 主编



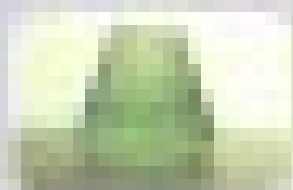
化学工业出版社

教育部《生物工程专业本科教育培养方案》

生物工程·生物技术



教育部
《生物工程专业本科教育培养方案》



教育部《生物工程专业本科教育培养方案》

普通高等教育“十一五”规划教材

生物工程·生物技术

综合实验

夏海武 主编



化学工业出版社

·北京·

图书在版编目 (CIP) 数据

生物工程·生物技术综合实验/夏海武主编. —北京: 化学工业出版社, 2009. 9
普通高等教育“十一五”规划教材
ISBN 978-7-122-06353-3

I. 生… II. 夏… III. ①生物工程-实验-高等学校-教材②生物技术-实验-高等学校-教材 IV. Q81-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 127078 号

责任编辑: 刘 畅 赵玉清

装帧设计: 刘丽华

责任校对: 周梦华

出版发行: 化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 装: 大厂聚鑫印刷有限责任公司

720mm×1000mm 1/16 印张 9 $\frac{3}{4}$ 字数 197 千字 2009 年 9 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888(传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 18.00 元

版权所有 违者必究

编写人员名单

主 编 夏海武
副主编 许振新 陈志霞 钱立生
参 编 蔡 华 苗永美 许 娜
叶龙祥 赵 岩

前 言

生物技术是人类科技史上最令人瞩目的高新技术之一，它对于提升国力，解决人类面临的食品短缺、疾病防治、人口膨胀、环境污染、能源匮乏等一系列重大问题带来了希望。国际上公认，信息技术和生物技术是 21 世纪关系到国家命运的关键技术和作为创新产业的经济发展增长点。

进入 21 世纪以来，不断涌现的生物技术创新成果表明了生物技术时代的到来。越来越多的科技工作者，尤其是青年学子投入到这一重要领域。为此，高等院校生命科学和农业科学类的多数专业都相继开设了生物技术方面的一些课程，主要包括细胞工程、基因工程、蛋白质工程及发酵工程等。

自从 1902 年德国著名植物学家 G. Haberlandt 首次进行高等植物的组织培养实验，并提出植物细胞全能性理论以来的一百多年中，许多学者对此进行了不懈的努力，引发了植物组织与细胞培养技术的蓬勃发展。特别是近半个世纪以来，细胞工程研究取得了惊人的进步，并在生产实践中得到广泛应用，已取得了巨大的效益。

1973 年 S. Cohen 等成功获得既抗卡那霉素又抗四环素的具有双重抗性的转化子菌落，标志着基因工程的诞生，并得到迅速发展。无论是在基础研究方面，还是实际应用中，都取得了惊人的成绩，从根本上改变了传统生物科学技术的被动状态，使得人们可以按照自己的意愿，克服物种间的遗传屏障，定向培养或创造出新的生物形态，以满足人们的需求。

1981 年 K. Ulmer 第一次提出蛋白质工程的概念，经过此后的二十多年的发展，蛋白质工程已经成为生命科学中的一个重要分支。因为蛋白质工程是在基因工程的基础上发展起来的，在技术方面有诸多同基因工程技术相似的地方，因此蛋白质工程也被称为第二代基因工程。

从 20 世纪 20 年代的酒精、甘油和丙酮等发酵生产时起，发酵工程在不断地发展和完善。特别是 20 世纪 70 年代以后，基因工程、细胞工程等生物工程技术的开发，使发酵工程进入了定向育种的新阶段，新产品层出不穷。

随着生物科学技术的不断发展，这四大工程的联系和相互渗透也更加深入，加之近年来高等学校为适应宽口径、厚基础的人才培养模式，越来越重视综合性实验的开设，一些高校相继开设生物工程或生物技术综合大实验，以取代过去每门课程中的小实验，实践证明，这种教学改革对学生的综合能力培养发挥了巨大作用。我们在近几年的教学中力求找到合适的生物工程或生物技术综合实验教材，但到目前还没有合适的综合实验教材出版，因此，我们组织部分进行综合实验改革的高校教

师编写了本书。

本教材在反映生物工程和生物技术最新进展的同时，特别注重基本实验技术的叙述，力求提高本书的实用性和可操作性，以方便广大师生使用。

在本书的编写过程中，我们得到了许多专家和老师的指导和帮助，还参考了国内外一些学者的文献资料，在此一并表示衷心的感谢。

由于本课程处于探索和发展中，我们对内容及体系的把握还需完善，加之作者的水平有限，编写时间也比较仓促，可能还有不少缺点和疏漏，恳请各位专家和读者批评指正。

编者

2009年6月

目 录

实验一 食用菌栽培	1
一、实验目的	1
二、实验原理	1
三、实验仪器	5
四、试剂与用品	5
五、实验步骤	5
六、思考题	10
实验二 植物组织培养	11
一、实验目的	11
二、实验原理	11
三、实验仪器	13
四、试剂与用品	13
五、实验步骤	13
六、思考题	26
实验三 植物原生质体的分离、纯化与培养	27
一、实验目的	27
二、实验原理	27
三、实验仪器	31
四、试剂与用品	31
五、实验步骤	31
六、思考题	34
实验四 植物染色体标本的精细制备、核型及带型分析	35
一、实验目的	35

二、实验原理	35
三、实验材料	36
四、实验仪器	36
五、试剂与用品	36
六、实验步骤	37
七、思考题	40

实验五 植物基因的克隆 41

一、实验目的	41
二、实验原理	41
三、实验仪器	48
四、试剂与用品	49
五、实验步骤	49
六、思考题	54

实验六 植物的遗传转化 55

一、实验目的	55
二、实验原理	55
三、实验仪器	65
四、试剂与用品	65
五、实验步骤	66
六、思考题	71

实验七 动物细胞培养 72

一、实验目的	72
二、实验原理	72
三、实验仪器	76
四、试剂与用品	77
五、实验步骤	77
六、思考题	84

实验八 动物细胞的基因克隆 85

一、实验目的	85
二、实验原理	85

三、实验仪器	87
四、试剂与用品	88
五、实验步骤	88
六、思考题	92

实验九 蛋白质的分离与纯化 93

一、实验目的	93
二、实验原理	93
三、实验仪器	108
四、试剂与用品	108
五、实验步骤	108
六、思考题	115

实验十 毛霉的分离和豆腐乳的制作 117

一、实验目的	117
二、实验原理	117
三、实验材料	117
四、实验流程	120
五、实验步骤	120
六、实验结果	124
七、思考题	124

实验十一 啤酒酿造 125

一、实验目的	125
二、实验原理	125
三、实验仪器	128
四、试剂与用品	128
五、实验步骤	128
六、思考题	138

附录 139

参考文献 148



实验一

食用菌栽培

一、实验目的

1. 学习食用菌栽培的原理、过程和基本方法。
2. 了解几种主要食用菌的生活习性及其栽培方法。

二、实验原理

(一) 食用菌简介

食用菌是可食用的大型真菌的总称。

食用菌的生活史即生活周期，过程如下：两个不同性别的担孢子分别萌发形成两条不同性别的单核菌丝；单核菌丝之间发生质配与核配形成双核菌丝；双核菌丝进一步生长，成熟扭结，形成子实体原基；子实体原基进一步生长分化形成子实体；在子实体内部产生担子，在担子上形成担孢子；担孢子成熟后从担子上脱落并弹射到空气中，遇到适宜条件又将萌发成单核菌丝。

菌丝体是食用菌的营养体，由丝状菌体细胞组成，是形成子实体（出菇）的基础，菌丝体质量的好坏，对是否出菇，产量高低，品质好坏起决定性作用。

子实体（蘑菇）是由菌丝体所产生的果实，是其行有性繁殖的必然结果。子实体一般包括以下几部分。

菌盖：是成熟子实体的主体部分，其主要作用是对菌褶的保护。

菌褶：大多数种类位于菌盖的下部，书页状排列或呈多孔状密布，是着生担子的所在，担子才是真正的繁殖器官，其顶部产生2~4个担孢子，担孢子成熟后从担子上脱落并弹射到空气中。

菌柄：起营养运输及对整个子实体的支撑作用。

菌托：菌柄与菌丝体及生长基质连接的地方，有时附着于子实体外保护层的残留物，有的品种无此结构，或不明显。

菌环：有的种类在子实体幼小时，菌盖的下部被一层薄膜（内菌幕）所覆盖，

保护年幼的菌褶不暴露，有内菌幕的种类称为被果型子实体，反之则称为裸果型子实体；被果型子实体在生长过程中，内菌幕逐渐破裂、脱落，在菌柄上残留下一个环状结构叫做菌环。当然，菌环也不是所有种类都有的。

（二）食用菌的营养需求

大多数食用菌为腐生型真菌，它们不能像绿色植物那样直接利用无机物同时利用阳光的能量生长，而只能靠分解及氧化有机物吸取自身生长所需的营养及能量。

食用菌的生长大体上可分为营养生长阶段（发菌）和生殖生长阶段（出菇）。将菌丝体接种在适宜的培养基上，在适宜的温度下，开始分泌一系列酶将一些大分子有机物分解成简单的可溶于水的小分子物质，吸收到细胞内供其生长发育。不同的生长阶段，对营养条件的要求有所不同，一般来说，菌丝体生长阶段培养基中氮素含量相对高些，子实体发育阶段培养基中氮素含量相对低些。因此作为科研和生产上讲，对于不同的阶段培养基中添加的营养成分应有所不同，比如：菌种保藏和菌种生产中培养基的氮源要多加一些，这样一方面有利于菌丝体的生长发育，另一方面可有效地防止在菌种上过早出菇的现象发生；而在出菇生产栽培料的配方中氮源成分应相对减少，这样有利于出菇。

1. 碳源

与绿色植物不同，真菌不能直接以 CO_2 作为碳源来合成有机物，它们只能以有机物作为碳源，如：葡萄糖、蔗糖、麦芽糖等单糖和双糖，淀粉、纤维素、半纤维素、木质素等多糖物质。除葡萄糖能直接被菌丝细胞吸收利用外，其他必须通过菌丝分泌的胞外酶水解成单糖后才能吸收利用。

2. 氮源

可供食用菌利用的氮源以有机氮为最佳，如：蛋白胨、酵母浸出汁以及麸皮、米糠等。在天然栽培基质如棉子壳、锯末、植物秸秆中也含有一些可供食用菌吸收利用的氮源，但是含量不够，需要添加麸皮、米糠等含氮量较高的材料，一些特殊品种还需要额外添加蛋白胨、酵母浸出汁等工业制剂。无机氮及小分子有机氮如各种含氮化肥，在微生物的作用下容易产生氨气抑制菌丝生长，因此除非特殊需求不要往栽培基质中添加，但必要时可作为喷施追肥。

碳氮比：指培养基及栽培基质中碳源和氮源的比例，以平菇为例菌丝体生长阶段的碳氮比为 20 : 1 最好，子实体发育阶段的碳氮比为 40 : 1 最佳。

3. 其他营养

食用菌生长发育除需要碳源和氮源外还需要一些其他营养物质，如：钙、磷、镁、锌、铁、铜、硫、钾、锰等矿物元素，各种维生素及生长因子。

（三）食用菌对环境条件的要求

1. 环境因素

（1）水分 水分既是菌丝生长所必需的环境条件，同时又是生物细胞的主要组成成分。基质中恰当的含水量对菌丝体生长及子实体发育是十分重要的，基质中含

水量过低，菌丝体对基质的分解及营养的吸收不利，使菌丝衰弱，会严重影响出菇产量；基质中含水量过高，会使下面菌丝体缺氧而停止吃料，造成原料的浪费，同时表面菌丝徒长，料面积水而使菌丝自溶导致杂菌污染。大多数种类食用菌要求基质含水量在65%左右，而香菇则要求在51%~55%之间，侧耳类品种有时可掌握在65%~70%之间。

(2) 酸碱度(pH值) 是指水(以及含水物质)的酸碱度，不同的品种适应不同的pH值范围，这是由品种自身在生理代谢过程中的产酸能力和它的生物酶活性范围决定的。

(3) 通气 食用菌属好氧型微生物，它要靠对基质内有机物的氧化来提供其生长发育所需的能量，基质内缺氧会使菌丝体的呼吸作用受到抑制，造成菌丝体生长缓慢，衰弱，甚至停止生长，严重的会因窒息而死亡；子实体阶段缺氧，会造成子实体畸形，影响商品价值。无论是菌丝体生长还是子实体发育，都需要充足的氧气。和人类的呼吸一样，食用菌的呼吸作用也是消耗空气中的氧气，放出CO₂。适量的CO₂浓度对某些种类的菌丝体生长有刺激促进作用，但是过多CO₂的积累会抑制菌丝体生长，甚至完全停止生长，高浓度CO₂长时间作用还会导致菌丝体窒息死亡。子实体阶段对CO₂更为敏感，主要表现在抑制菌盖分化，菌柄过长，降低成品等级。因此，需要经常的对菇房空间进行通风换气，排除CO₂，保持空气新鲜。

(4) 温度 计量温度的标准叫温标，国际上通常使用的温标为摄氏温标。每个食用菌品种都有其一定的温度适应范围，即使同一个品种其菌丝体阶段与子实体阶段也是不同的，一般来说，子实体阶段的最适温度要低于菌丝体阶段。

根据子实体分化形成的适宜温度范围不同，可将食用菌分为低温型、中温型和高温型：

① 低温型 在较低的温度下菌丝才能分化形成子实体，最适温度20℃以下，最高不超过24℃，如：香菇、金针菇、双孢菇、紫孢平菇、羊肚菌、猴头菌等；

② 中温型 子实体分化的适宜温度20~24℃，最高不超过28℃，如：白木耳、黑木耳、榆黄蘑、大肥菇等；

③ 高温型 子实体分化要在较高的温度下，最适温度24~28℃以上，最高可达40℃左右，如：草菇、凤尾菇、鲍鱼菇等。

此外，不同品种在子实体形成期间对温度变化的反应也各不相同，根据这一点又可以把食用菌分成以下两大类型：

① 恒温结实型 保持一定的恒温可以形成子实体，如：金针菇、双孢菇、黑木耳、草菇、猴头等；

② 变温结实型 保持恒温不形成子实体，变温时才形成(需要温差刺激)，如：香菇、平菇、紫孢平菇、阿魏侧耳(白灵菇)等。

(5) 空气湿度 前面讲过基质的含水量对菌丝的生长至关重要，但是，到了子实体生长发育阶段则完全或部分暴露在外部环境中，因此空气的含水量，即空气湿

度就成了主要的影响因素之一。空气湿度过低会加速子实体表面的水分蒸发，而子实体所蒸发的水分则主要来源于基质内的菌丝体，结果会导致基质内水分的大量流失而影响产量，甚至使子实体原基干枯而死。然而水分蒸发是由菌丝体向子实体运输营养的原动力，如果空气湿度过高，就会使子实体表面水分停止蒸发，使营养运输受阻，同时呼吸作用受到抑制，造成子实体停止生长；长时期空气湿度过高，还会造成子实体从空气中倒吸水分，这将是十分危险的，特别是衰老的子实体，会形成水浸样腐烂，招致线虫及细菌的滋生和大范围传染。所以说，保持适当的空气湿度是十分重要的。

大多数品种在出菇阶段要求空气相对湿度在80%~95%之间，有经验的菇房管理人员可以凭感觉判断空气湿度是否合适，但是对于新手来说往往是十分困难的，这里就需要科学的计量手段——湿度计来准确测量。

(6) 光照 食用菌的菌丝体阶段不需要光线，而大部分品种的出菇阶段则需要散射光刺激。少部分品种需要有较强的散射光，才能使子实体原基分化，例如白灵菇、灵芝等；极少部分品种在完全黑暗的环境中也能形成子实体；子实体的颜色也与光线强度有密切关系，一般来说，光线强，子实体颜色较深，光线弱，子实体颜色浅。

2. 环境因素的综合调控

野生的食用菌都发生在雨后茂密的树林和草原上，所以可以这样直观的理解适合出菇环境条件：雨后的树林和草原的温度适宜，空气潮湿，清新宜人的新鲜空气适宜食用菌生长，透过树冠、草叶的太阳光柔和自然，地面日积月累的草根树叶等有机物加上土壤中所含有的矿物质正是菌丝体生长的最佳营养，所有这些形成了食用菌类生长的最佳条件。

各种环境因素都不是独立存在的，它们之间相互影响，相互制约，形成了一个对立统一的整体。在大棚温室内就显得尤为突出：光照会提高温度，温度上升又会使空气相对湿度下降；通风会直接影响室内的温度和湿度，影响程度与通风量和室内外空气的温湿度差异呈正相关性，通风量越大，对室内温湿度的影响越大，通风量越小，对室内温湿度的影响越小。一般来说，大棚温室作为冬季菇房，通风会同时降低室内的温度和湿度。

以上是自然因素对菇房环境的影响，下面我们来讨论人为因素对菇房环境的影响：喷水是菇房常规管理的主要工作内容，喷水的直接作用是增加空气相对湿度，水雾越细，加湿效果越好。喷水时，水雾在空中蒸发，在增加湿度的同时还要从空气中吸收热量，在一定程度上能起到降温作用。

自然因素对菇房环境的影响也是在人为控制之下的，可以通过挂遮阳网和拉、放草帘来人为调节温室内的光照和温度，通过开关通风口来控制通风。喷水可直接增加空气湿度，通入干冷的空气，可降低菇房的温度和空气相对湿度。白天可通过增加光照来提高温度，夜间可放下草帘保温，若温度仍低于最低要求，可采取火炉、火墙、暖气等加温措施。

三、实验仪器

高压蒸汽灭菌锅, 超净工作台, 恒温培养箱, 接种箱, 电子天平, 秤, 电炉, 喷雾器等。

四、试剂与用品

葡萄糖, 琼脂, 磷酸二氢钾, 硫酸镁, 氯化汞, 石膏粉, 过磷酸钙, 尿素, 白糖, 来苏儿, 乙醇, 塑料袋, pH 试纸, 纱布, 水果刀, 试管, 三角烧瓶, 罐头瓶, 酒精灯, 剪刀, 接种针, 接种刀, 接种铲, 温度计, 湿度计等。

五、实验步骤

(一) 食用菌母种的制作

菌种是生产的根本, 制种是食用菌生产中的基本环节。食用菌栽培, 其成败与否以及产量高低, 质量好坏, 都与菌种质量优劣有关。优质高产的菌种, 不但生长迅速, 而且抗杂菌性强, 生产周期短, 产量高。生产上用的母种, 不管是从外地引进的, 还是自己分离的菌种, 对母种的转接一般应控制在三代以内, 且菌龄要适宜。优质母种的特征: 菌丝洁白、浓密、粗壮、生长整齐, 不产生色素, 气生菌丝少, 有菇香味。

1. 母种培养基配方

所用琼脂培养基又叫 PDA 培养基, 常用配方为: 马铃薯 200g, 葡萄糖 20g, 琼脂 20g, 磷酸二氢钾 1g, 硫酸镁 0.50g, 水 1000mL, pH 值 5.50~6.50。

2. 培养基的制备

选择未发芽、无病害、不发青的新鲜马铃薯洗净去皮, 称取 200g, 切成小块, 装入烧杯(量杯)中, 加入清水 1000mL, 加热煮沸维持 20~30min, 至马铃薯酥而不烂为度, 加热过程中稍加搅拌, 然后用 3 层纱布过滤, 取其滤液, 补水至 1000mL, 在马铃薯汁液中加入琼脂, 继续加热搅拌至琼脂完全溶化, 最后加入葡萄糖、磷酸二氢钾、硫酸镁, 加水补至 1000mL, 用 pH 试纸测定并调节 pH 值。在正常操作的情况下 pH 值常在要求范围内, 常可忽略测定。分装在试管中, 高度为试管高度的 1/8~1/5, 加棉塞, 包扎, 放在高压锅内灭菌, 指针指到 0.04MPa 时排放冷空气, 再升压到 0.105MPa 维持 30min, 自然降温到 60℃左右出锅, 摆成斜面。

3. 母种的分离选育

母种主要采用人工选择、诱变育种、杂交育种和原生质融合等手段获得。作为一般制种来说, 可以采用人工选择方式分离培育母种, 具体步骤与操作方法如下。

(1) 采集种源 从野生或人工栽培群体中, 选择有代表性的优良菇体作为种源。种菇的标准是: 八成熟, 朵形圆正、肉质肥厚, 无病虫害。采集 1~2 朵符合上述标准的种菇编上号码, 作为分离母种的材料。从栽培室采集的应标有原菌株代号。

(2) 母种分离方法 有孢子弹射、组织分离和基内分离 3 种方法。①孢子弹射法。将种菇表面消毒, 吸干水分后, 将菇体悬挂于装有琼脂培养基的三角瓶内, 让菇体内的孢子自然散落在培养基上萌发菌丝。也可以剪取一小块菇体, 贴附在试管斜面培养基表面, 让孢子散落在培养基上萌发菌丝, 即能获得母种。②组织分离法。将消毒过的种菇, 在接种箱内用手从菇柄处对半解开, 或用刀片切开, 使菇体形成对开。在菌盖和菌柄交界处或菌褶处, 用接种刀切取一小块菇体, 然后纵切成 $5\text{mm} \times 10\text{mm}$ 的小薄片, 用接种针挑取一块薄片, 接入斜面培养基的中央, 每支试管接种一小块薄片, 待其萌发菌丝, 即可得到母种。③基内分离法。选择已长菇的木段, 削去树皮及表层木质部, 用 70% 的酒精消毒后, 锯成 1cm 厚的薄片, 放入 0.1% 的升汞水中消毒 1~2min, 再用灭菌水洗去残液。然后再将小薄片劈成 0.5~1cm 宽的小条, 接入斜面培养基中央, 待长出菌丝后即得母种。也可以在已长菇的菌袋中, 经消毒处理后, 用接种针钩取袋内色泽纯、长势旺的菌丝体, 接种在试管斜面培养基中央, 待萌发菌丝后, 同样可获得菌种。

(3) 适温培养 通过上述不同方式将菌种分离接种于试管后, 要及时将试管移入已消毒的培养箱或培养室内培养, 温度控制在 25°C 左右, 空气相对湿度 65% 左右, 使分离获得的孢子或菌丝在适温下发育。一般孢子弹射 3~4d 后孢子萌发成菌落, 10d 后菌丝长满管; 组织分离接种后 2~3d, 菌丝即萌发, 并在培养基上蔓延生长; 菇木分离接种后, 7d 菌丝即恢复生长。

(4) 选育提纯 通过上述方法得到的菌丝, 不一定是优质的, 还需要选育提纯。因此, 在菌丝萌发后, 要认真观察, 挑选色泽纯、健壮、长势正常、无间断的菌丝, 在接种箱内连同培养基钩取菌丝, 接入另备的试管培养基上。在 $23\sim 25^{\circ}\text{C}$ 的恒温条件下, 培养 7~10d, 待菌丝长满管后, 再进行观察, 从中择优取用, 即为“母代”母种。

(5) 转管扩接 母代母种可以转管扩接成“子代”母种。采用同样的斜面培养基, 每支可扩接 30~50 支子代母种。生产上供应的多为子代母种。它可以再次转管扩接。一般每支可扩接成 20~25 支子代母种, 但转管次数不得超过 5 次。

4. 母种保存

母种放入冰箱保存。

(二) 食用菌原种的制作

1. 原种培养基配方

(1) 小麦(玉米): 95%; 石膏粉: 2%; 过磷酸钙: 2%; 尿素: 0.5%; 白糖: 0.5%; pH 值: 5.50~6.50。

(2) 籽壳: 87%; 麸皮: 10%; 石膏粉: 1%; 过磷酸钙: 1%; 尿素: 0.5%; 白糖: 0.5%; 加水 120%~130%。

2. 原种培养基的制备

(1) 将小麦(玉米)筛检干净, 称量, 置清水中浸泡 2h, 再放入开水中边煮边搅动, 随时检查煮的程度, 特别是煮到 15min 后更要勤检查, 待麦粒(玉米)

无白心，熟而不烂（不能开花）时立即捞出，放在尼龙布或干净的表面上晾晒。见麦粒（玉米）表面没有多余的水分时，加入石膏粉、过磷酸钙等，搅拌均匀，装瓶（用500g的罐头瓶）瓶口盖两层报纸，上覆1张耐高温的塑料，用橡皮圈扎紧，灭菌时要求压力在0.105MPa，维持2~3h，灭菌时应注意排冷空气的时间，注意不要超压。

(2) 先称取原料，将白糖、石膏粉、尿素、过磷酸钙等先溶化，制成母液，按大约所需水稀释，然后将棉籽壳拌湿，堆放2~3h，搅拌加麸皮，拌匀，用手紧捏培养料，以指缝中有水外渗而不往下滴为适宜。装瓶时稍压实，加塞及灭菌的方法同上。

3. 接种培养

原种的培养基出锅冷却至室温时进行接种，每只母种试管可接5~6瓶原种。培养条件同母种，一般经20~25d即可长满瓶子。优质原种的特征是菌丝洁白、整齐，瓶壁及表面布满菌丝，有菇香味。

(三) 栽培种的制作

1. 培养基制备及配方

同制原种。

2. 接种培养

首先用75%酒精或3%来苏儿擦手及原种瓶外消毒，然后用消毒的接种铲翻松原种，在接种箱内（超净工作台上）的酒精灯火焰上方倒少许原种于灭菌的瓶料中，每瓶原种接20~25瓶，培养条件同原种。一般20~25d即可长满，长满后应立即接种。若暂时不用，可在10~14℃下干燥保存，时间不超过10d；2~4℃时保存不超过20d。经低温保存的栽培种，在使用前将菌种放在常温下恢复1~2d。

使用麦粒（玉米）菌种时制作方法简便、省工、菌种质量好，培养时摇瓶1~2次，菌丝与麦粒混合均匀，上下菌丝生长一致。而使用棉籽壳作原料成本低，每500g棉籽壳约可装5瓶，生长快，菌种质量好。与麦粒相比，操作略麻烦，在原种扩栽培种时，须借助接种铲才能完成。

(四) 栽培工艺

不同品种可采用不同的栽培方式，即使同一品种也可采取不同的栽培方式，如：①生料袋栽方式；②生料床栽方式；③常规熟料袋栽方式；④发酵熟料栽培方式；⑤一次发酵栽培模式（袋栽/床栽）；⑥二次发酵栽培模式（袋栽/床栽）等。

1. 生产用培养料的准备和处理

(1) 棉子壳 新鲜，干燥，松散；无霉变，无结块泛黄等现象。如有结块，必须挑除。

(2) 锯末 阔叶树锯末，无霉变，不含防腐剂，自然堆放半年以上。需过筛，去除粗、硬、尖锐杂物。

(3) 玉米芯 干燥，未经雨淋受潮，无霉变。用筛孔10~15mm的粉碎机加