

园艺植物生物技术实验指导

编写说明

课程编码：1306102040

课程教学总学时：36

课程实验总学时：10

总学分：2

适用专业：园艺

先修课程：植物学；植物生理学；园艺植物遗传学

一、目的与任务

实践课堂主要内容，了解生物技术相关实验设施，掌握生物技术基本实验操作，培养学生的动手操作能力、分析和解决问题的能力。

二、实验教学的基本要求

通过本课程的学习了解生物技术实验室的设计、常用仪器设备的基本操作；掌握园艺植物组织培养基本流程及技术，初步掌握以基因工程为核心的相关技术操作。

三、实验教学的时数安排

总学时 10 学时，各实验学时数分配见下表：

序号	实验	学时
实验一	培养基母液的配制	2 学时
实验二	培养基的配制与灭菌	2 学时
实验三	无菌操作及植物的初代培养	2 学时
实验四	植物的增殖及生根培养	2 学时
实验五	园艺植物 DNA 的提取及电泳检测	2 学时

实验一 培养基母液的配制

一、目的要求

1. 掌握培养基的化学组成；
2. 掌握培养基母液的制备方法；

二、原理

培养基主要是由水分、无机物质、有机物质、植物生长调节物质和凝固剂五部分构成。

在植物组织培养中，配制培养基是经常性的工作。为了准确称量和快速移取，以及便于贮藏，通常是把培养基先配制成一系列浓缩液，即母液。母液的浓缩倍数一般为 10~100 倍，可分为大量元素母液、微量元素母液、有机物质母液、铁盐母液和植物生长调节物质母液五种。

三、实验用品

配制 MS 培养基所需药品：生长调节剂（NAA、IBA、6-BA 等）；电子分析天平；烧杯；量筒；定容瓶；蒸馏水；95%酒精；0.1mol/LNaOH；0.1mol/L HCL；母液瓶；标签纸；冰箱等。

四、配制方法与步骤

（一）母液配制步骤

1. 称量：用电子天平分别称取不同种类药品，分别放入烧杯中。

注意：

- （1）药品的摆放；
- （2）不同天平的使用方法。

2.溶解：将称取的药品分别充分溶解。

注意：

- （1）不同药品溶解方法；
- （2）溶解体积的总体把握。

3.混合：于容量瓶中依次混合上述已溶解的药品；

4.定容：加蒸馏水定容至刻度线，即成母液。

（二）MS 母液配方

母液种类		成分	规定量 (mg)	扩大 倍数	称取量 (mg)	母液体积 (ml)	配 1 升培养 基吸取量 (ml)
编号	种类						
1	大量元素	KNO ₃ NH ₄ • NO ₃ MgSO ₄ • 7H ₂ O KH ₂ PO ₄	1900 1650 370 170	10	19000 16500 3700 1700	1000	100
2	钙盐	CaCl • 2H ₂ O	440	10	4400	1000	100
3	微量元素	MnSO ₄ • 4H ₂ O ZnSO ₄ • 7H ₂ O H ₃ BO ₃ KI Na ₂ Mo ₄ • 2H ₂ O CuSO ₄ • 5H ₂ O CoCL ₂ • 6H ₂ O	22.3 8.6 6.2 0.83 0.25 0.025 0.025	100	2230 860 620 83 25 2.5 2.5	1000	10
4	铁盐	Na ₂ -EDTA FeSO ₄ • 7H ₂ O	37.3 27.8	100	3730 2780	1000	10
5	有机元素	甘氨酸 盐酸硫胺素 (VB ₁) 盐酸吡哆醇 (VB ₆) 烟酸 肌醇	2 0.1 0.5 0.5 100	50	100 5 25 25 5000	500	10

五、母液的保存

1. **装瓶：**将配制好的各母液分别倒入母液瓶中，贴上标签，注明母液种类、浓度、配制日期。
2. **保存：**将各母液瓶放入冰箱内于 0-4 度下低温保存。

六、作业

1. 模拟称量药品，要求达到快速、准确；
2. 简述各种母液的配制方法与注意事项；
3. 熟悉 MS 基本培养基的配方组成。

实验二 培养基的配制与灭菌

一、目的要求

1. 熟练掌握配制 MS 工作培养基的基本技能;
2. 掌握母液移取、培养基的熬制与分装、扎口技术与灭菌方法。

二、原理

配制工作培养基时, 按照标准配方和终体积, 依次量取各种母液于容量瓶(或烧杯)中, 再定容至终体积即可。

培养基的灭菌通常采用高温高压湿热灭菌法, 即在密闭的锅体内, 随着压力的上升, 水的沸点也随之增加, 从而大幅度提高水蒸气的温度。在 121℃下, 保持 15~20min, 即可达到灭菌目的。

三、用品

MS 培养基的各种母液; 琼脂; 蔗糖; 蒸馏水; 1mol/L NaOH; 1mol/L HCL; 移液管; 量筒; 容量瓶; 三角瓶; 标签; 记号笔; 封口膜; 电炉; PH 试纸(5.0-7.0); 高压灭菌锅等。

四、方法与步骤

1、工作培养基的配制与分装

(1) 按照母液顺序和所需量, 用量筒和专一对应的移液管依次量取下列各母液于容量瓶中;

大量元素母液: 100ml;

微量元素母液: 10 ml;

铁盐母液: 10 ml;

有机物质母液: 10 ml;

激素类母液: 按照需要。

(2) 定容: 加蒸馏水至刻度, 摇匀;

(3) 熔化(熬制): 将容量瓶内的培养基倒入铝锅中, 另将预先称好的 6~10g 琼脂和 30g 蔗糖也加入锅中, 加热煮化。先用旺火烧开, 再用文火煮溶。注意经常搅拌, 防止糊底。

(4) 调 pH: 用 pH 试纸测试 pH 值, 可用 1mol/LNaOH 或 1mol/L HCL 将其调到 5.8 左右(或用经验法)。

(5) 分装与扎口: 将调好 pH 值的培养基分装到三角瓶内。使用 100~150ml 的三角瓶, 每瓶装 20~30ml 培养基。分装后立即扎紧瓶口, 标明培养基的名称、配制时期等。

2、培养基的灭菌

培养基分装完成后，应在 24h 内灭菌。灭菌过程如下：

- (1) 加水；
- (2) 装锅；
- (3) 盖盖；
- (4) 加热；
- (5) 排放冷空气；
- (6) 升压保温；
- (7) 降压排气；
- (8) 出锅冷却。

注意事项：

1. 灭菌锅内冷空气必须排尽，否则，压力表指针虽达到了一定压力，但由于锅内冷空气的存在并达不到相应的温度，从而影响灭菌效果。
2. 在灭菌过程中，当压力达到时，要严格控制时间，时间太长会使培养基中的一些化学物质遭到破坏，影响培养基的成分，而时间太短则达不到灭菌效果。

五、作业

1. MS 培养基的配制步骤？
2. 培养基灭菌的基本环节？

实验三 无菌操作及植物的初代培养

一、目的要求

通过在超净工作台上进行无菌操作训练，掌握外植体的接种技术。

二、用具

1. 实验材料：植物的根、茎、叶或种子等。
2. 实验试剂：75%、95%的酒精，0.1%的升汞（或10%的漂白粉上清液），无菌水等。
3. 实验用具：超净工作台、盛有培养基的三角瓶、接种器械（解剖刀、剪刀、镊子等）、酒精灯。

三、方法和步骤

1. 接种前的工作

- （1）用肥皂水洗净双手，穿上灭菌过的专用实验服、帽子、口罩、拖鞋（鞋套），进入接种室。
- （2）用75%的酒精喷洒并擦拭工作台，放入酒精灯及接种器械（浸泡在75%酒精中）。
- （3）打开超净工作台上的紫外灯和无菌操作间的紫外灯，照射20~30min。
- （4）打开超净工作台上的鼓风机以及接种间的空调，换气10~20min。
- （5）用蘸有75%酒精的纱布擦拭双手。
- （6）把解剖刀、剪刀、镊子等器械，在火焰上灭菌后，放在器械架上备用。

2. 外植体的灭菌处理

把培养材料放进75%的酒精中浸泡约30s，用无菌水快速冲洗1次，再在0.1%的升汞(氯化汞, HgCl_2)中浸泡5~10min，或在10%的漂白粉上清液中浸泡10~15min，浸泡时可进行搅动，使植物材料与灭菌剂有良好的接触；然后用无菌水冲洗3~5次后待用。

3. 外植体的分离与接种

- （1）用接种器械在消过毒的培养皿中对灭菌后的材料进行必要的处理，分离出所需的外植体。
- （2）打开三角瓶口、用接种器械接入外植体，用封口膜密封三角瓶口。
- （3）操作期间应经常用75%酒精擦拭工作台和双手；接种器械经常在75%的酒精中浸泡和并在火焰上灼烧。

4. 接种后工作

- （1）接种结束后，清理超净工作台台面并用酒精喷洒、擦拭消毒，经20min紫外灯灭菌后关闭工作台。
- （2）将接种后的培养材料置于培养间中进行培养，并定期观察记载外植体的变化。

四、作业

1. 介绍外植体灭菌的基本操作。
2. 简述无菌操作的基本程序。

实验四 植物的增殖及生根培养

一、目的

通过实验，掌握运用植物生长调节物质调控植物器官分化的方法。并进一步熟悉无菌操作方法。

二、原理

以植物的茎、叶等部分作为外植体进行离体培养，可以直接诱导器官分化，产生芽、根，形成新的植物体；也可以诱导其改变原来的分化状态脱分化形成愈伤组织，“再分化”出根和芽等器官。在该过程中，植物生长调节物质起着决定作用，调控着培养细胞再生的不同方式。

三、实验材料、试剂和器具

1. 实验材料：菊花试管苗
2. 试剂：MS 母液，各种植物生长物质
3. 仪器设备：无菌器材：生根培养基；3~4 瓶 4~6 周龄菊花试管苗；3 个不锈钢托碟+吸水纸； 大号、中号镊子各 2 把；2 把解剖刀非无菌材料：1 个广口瓶(500ml)，内装 75%酒精及棉球； 1 个锥形瓶（250ml），内装 75%酒精 150ml ； 2 盏酒精灯及火机 1 个；橡皮筋若干、标签纸、记号笔、喷雾器、鞋套；1 把大号镊子。

四、实验步骤

- 1.培养基准备。生根培养基，1/2MS+NAA0.1mg/L+3%糖+1.0%琼脂
- 2.接种室灭菌。
- 3.接种培养，在超净工作台上进行无菌操作。将菊花培养瓶转移到接种室，在将瓶放入超净工作台前用 75%的酒精棉球擦拭瓶外表面，减少附在瓶外壁上的灰尘与微生物。选取生长粗壮的无根苗，切成 2~3cm 的茎段，转入生根培养基中，于温度 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，光强 2000lx，光周期为 12h 的环境下培养。当幼苗基部伤口愈合，并出现白色根尖突出物时即可进炼苗和移栽管理。

五、实验报告

- 1.观察并记录无根苗在生根培养基上培养 3~4 周后的不定根发生情况（发生时间、根的外观与分布状况），并计算生根率。

生根率（%）=生根无根苗数/接种无根苗总苗数 $\times$ 100%

2. 思考题

3. 植物芽和根的分化与植物生长调节物质有何关系？

实验五 园艺植物 DNA 的提取及电泳检测

一、实验目的

DNA 提取是开展分子生物学的重要前提之一，高质量的 DNA 直接关系到分子标记、基因克隆、图谱构建及功能基因组研究等工作的成败。本实验旨在锻炼同学们 DNA 操作及检测的基本技能，掌握用改良 CTAB 法提取园艺植物总 DNA 的原理和方法，并分别用分光光度法和凝胶电泳法检测出所提 DNA 的质量，为将来从事园艺植物生物技术研究奠定基础。

二、实验原理

1. DNA 提取：CTAB 是一种阳离子去污剂，具有从低离子强度溶液中沉淀核酸和酸性多聚糖的特性，在高离子强度的溶液里，CTAB 则与蛋白质和大多数酸性多糖以外的多聚糖形成复合物，而不能沉淀核酸。在制备基因组 DNA 时，CTAB 加入调节至高离子强度（ $>0.7\text{mol/L NaCl}$ ）的裂解液中，经过连续的酚和氯仿抽提去除 CTAB/黏多糖/蛋白质复合物，用异丙醇/无水乙醇沉淀上清即可获得基因组 DNA。

2. 分光光度（紫外吸收）法检测 DNA 质量：DNA 的吸收峰在 260nm，对于双链 DNA， $\text{OD}_{260}=1.0$ 时溶液浓度为 $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ ，这样通过用紫外分光光度计测定所提 DNA 溶液在 260nm 的吸光值，可以计算出所提 DNA 的浓度，计算公式为： $\text{DNA 样品浓度}(\text{ }\mu\text{g/ }\mu\text{l}) = \text{OD}_{260} \times \text{N}(\text{样品稀释倍数}) \times 50/1000$ 。而蛋白质的吸收峰在 280nm，核苷酸等小分子量物质的吸收峰在 230nm，这样通过测定 OD_{280} 和 OD_{230} 的吸光值，计算出 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 及 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ 的比值后，可以判断所提 DNA 的纯度：纯的 DNA 溶液其 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 应为 1.8， $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ 应大于 2.0。 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 大于 1.9 时，表明有 RNA 污染；小于 1.6 时表明有蛋白质或酚污染。 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ 小于 2.0 时，表明溶液中有残存的盐和小分子杂质，如核苷酸、氨基酸、酚等。

3. 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量：琼脂糖是一种天然聚合长链状分子，沸水中溶解， 45°C 开始形成多孔性刚性滤孔，凝胶孔径的大小决定于琼脂糖浓度。DNA 分子在碱性环境中带负电荷，在外加电场作用下向正极泳动。DNA 分子在琼脂糖凝胶中泳动时，有电荷效应和分子筛效应。不同 DNA，其分子量大小及构型不同，电泳时的泳动率就不同，从而分出不同的区带。琼脂糖凝胶电泳法分离 DNA，主要是利用分子筛效应，迁移速度与分子量的对数值成反比关系。溴化乙锭（EB）为扁平状分子，在紫外光照射下发射荧光。EB 可与 DNA 分子形成 EB-DNA 复合物，其发射的荧光强度较游离状态 EB 发射的荧光强度大 10 倍以上，且荧光强度与 DNA 含量成正比。用肉眼观察，可检测到 5ng 以上的 DNA。

三、主要仪器、用具与试剂

1.主要仪器：水浴锅、高速冷冻离心机、电泳装置（电泳仪和电泳槽）、凝胶成像系统、电子天平、恒温水浴锅、烘箱、微波炉等。

2. 用具：2ml 离心管（3 只/个材料）、1.5ml 离心管（3 只/个材料）、研钵（每人 1 套）、小剪刀、棉纱手套、不锈钢药匙、2ml 离心管架、1.5ml 离心管盒、吸耳球、1ml 移液枪、1ml 吸头、1ml 吸头盒、100 μ l 移液枪、200 μ l 吸头、200 μ l 吸头盒、10 μ l 移液枪、10 μ l 吸头、10 μ l 吸头盒、冰盒、各种规格的试剂瓶若干个。

3. 试剂：液氮、2 $\times$ CTAB 提取液【CTAB 2%，Tris-HCL(pH8.0) 100mmol/L，EDTA (pH8.0) 20mmol/L，NaCl 1.4 mol/L，PVP 1%(w/v)，ME（巯基乙醇）0.1%(v/v) 用时现加】，氯仿/异戊醇（24 : 1），无水乙醇，70%乙醇，异丙醇，RNA 酶，TE 或双蒸水。

四、试材

新鲜健康园艺植物叶片。

五、实验方法与步骤

1. 药品（CTAB 提取液）的配制

(1) 100 mM Tris-HCl(PH 8.0),1.5 M NaCl,50 mM EDTA(PH 8.0)

(2) 1% PVP，2% CTAB

(3) 取少许(1)加到(2)中，搅拌成糊状,后加(1)至足量,65℃水浴充分溶解备用。使用前要在 65℃温浴一会儿，然后加入 1-4%巯基乙醇,混均匀。

(4) 苯酚：氯仿：异戊醇（25：24：1）：重蒸酚 65℃水浴溶解，在烧杯中加入 80ml 温热的蒸馏水，加入少许 8-羟基喹啉，溶解后加入 100ml 重蒸酚，再加入 100ml 氯仿：异戊醇（24：1），加入 20 克 Tris Base，磁力搅拌器上搅拌 1.5 h 左右至停止搅拌后很快分层，然后装入棕色瓶中，4℃冰箱中储存备用。

2. DNA 的提取

(1) 在所需量的 2 $\times$ CTAB 提取液中加入 0.1%巯基乙醇（ME）；

(2) 取 0.5~1g 材料，加液氮磨成粉，将磨好的材料转入 2ml 的离心管中，加 1ml CTAB 提取液，充分混匀，置于 65℃水浴 60min，期间不断摇动；

(3) 冷至室温，加入等体积的氯仿/异戊醇（24 : 1），轻轻摇动至溶液成乳化状，10000rpm，离心 5min；

(4) 取上清液，重复（3）步 1 次；

(5) 取上清液，加入 2/3 体积的异丙醇，-20℃放置 30min；

(6) 10000rpm，离心 5min，弃上清液，用 70%乙醇洗沉淀 2-3 次；

(7) 加入灭菌 TE 或双蒸水溶液溶解沉淀，加入 1/10 体积 NaAC（3mol/L）和 2 倍体积无水乙醇，-20℃放置 2h 以上；

(8) 12000rpm 离心 5min, 弃上清液, 沉淀用 70%乙醇洗 2-3 次, 室温干燥沉淀;

(9) 用 50-100ul 灭菌 0.1%TE 或双蒸水溶解沉淀, 即为所需的 DNA 样品, 未用部分, -20℃ 保存。

(10) 琼脂糖凝胶电泳分析: 用 0.8%的凝胶, 点 4 μl 所提的样品, 电泳检测精制 DNA 质量, 估算出浓度。

(11) 把所提 DNA 溶液, 稀释至 5ng/μl 的浓度, 4℃下保存备用。

3. DNA 检测

(1) 取 DNA 原液 15 μl 稀释至 3.0 ml, 用 UV-1601 型紫外分光光度计测定 230nm、260 nm 及 280 nm 的吸光值。高质量的 DNA 要求: $A_{260}/A_{230} > 2.0$; $1.7 < A_{260}/A_{280} < 1.9$

(2) 将 DNA 原液适当稀释后, 用 $1 \times$ TAE, 0.8%琼脂糖凝胶 2V/cm 电泳 1 h 进行质量检测。

(3) 用 $0.5 \times$ TBE, 0.8%琼脂糖凝胶 2.5V/cm 电泳 1.5-2 h 进行检测。

六、具体做法

2 人一组, 每人选择一种园艺植物按照实验步骤提取基因组 DNA。

七、实验报告

每人写一份, 按学术论文格式参考老师提供的范文撰写, 包括: 题目、作者、正文(前言、材料和方法、结果与分析、讨论、参考文献)等, 其中结果中要附上自己所提样品的电泳图。

八、实验注意事项

1.实验中的液氮、氯仿、苯酚、EB 等都是危险或有毒物质, 操作时要戴手套, 并在专门区域操作。

2.DNA 电泳时只能由负极到正极, 电泳时要注意电极是否正确。

九、思考题

简述 DNA 提取的步骤及主要试剂的作用。