



山東農業大學
SHANDONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

实验的基础知识

山东农业大学生命科学学院

基本实验条件因素

- ◆ 实验室规模与布局
- ◆ 仪器设备数量与档次
- ◆ 实验功能与水平
- ◆ 现实应用与发展规划



- ★ 实验的性质
- ★ 实验工作量
- ★ 建设经费多少
- ★ 来源和维持能力

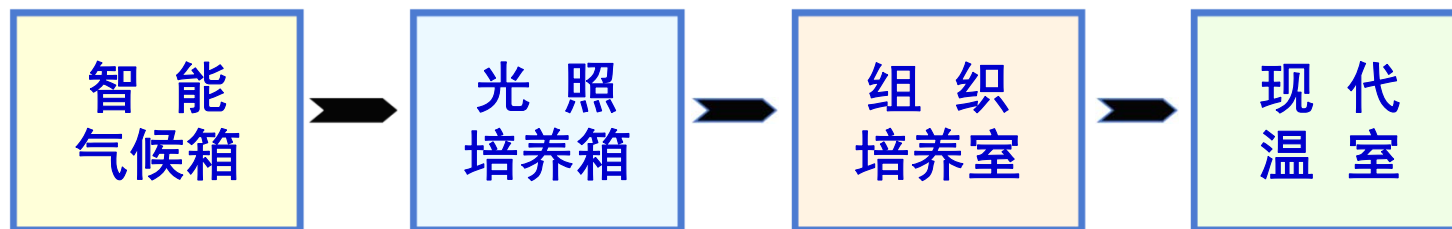


实验功能体系

- ◆ 器具清洗保存
- ◆ 药品制备存放管理
- ◆ 实验材料准备与组培
- ◆ 环境因子系统调控
- ◆ 观察与数据采集处理
- ◆ 各种无菌操作
- ◆

实验室系统

- ◆ 常规操作室
- ◆ 组织培养室
- ◆ 无菌操作室
- ◆ 细胞培养室
- ◆ 实验准备室
- ◆ 精密仪器室
- ◆ 现代化温室
- ◆ 管理工作室



- 常用基本实验技术

- ◆ 玻璃仪器及小型用具洗涤
- ◆ 药品制备与保存
- ◆ 无菌操作
- ◆ 灭菌与消毒
- ◆ 数据的采集与处理
- ◆ 仪器设备使用

- 调控的三类因子

- ◆ 物理：温度. 湿度. 光照等
- ◆ 化学：营养. 渗透压. pH等
- ◆ 生物：基因型. 外植体. 生理状态等

第1节 实验室的基本知识

一、实验室基本系统

(一) 常规实验室

●1. 基本功能

- ◆器具清洗干燥保存
- ◆药品配制和灭菌
- ◆蒸馏水重蒸水生产
- ◆生理生化等分析
- ◆化学试剂、玻璃器皿存放等



● 2. 仪器配置

◆家具类：实验台. 实验凳. 实验架. 药品橱等

◆小型仪器：台式离心机. 电磁炉. pH计等。

◆实验用具：镊子. 剪刀. 解剖刀等。

◆冷冻冷藏：电冰箱. 电冰柜等。



● 3. 基本要求

- ◆ 足够空间，满足药品配制、材料处理和实验观察等。
- ◆ 数据采集设备，配备数码相机等。
- ◆ 具备必要安全设施和条件。
- ◆ 具备必要的存储设施，隔离设施等。
- ◆ 专用电源，与仪器匹配。
- ◆ 重蒸水装置等。
- ◆ 多媒体等教学设备。



(二) 无菌操作室 (即接种室)

1. 基本功能

植物材料消毒处理. 接种. 继代. 转移等。

2. 仪器配置

主要超净工作台. 将空气过滤后形成无菌的风, 在工作台面内形成无菌环境。



3. 基本要求

- ◆定期消毒, 安装紫外灯, 接种前约20min灭菌。
- ◆无尘. 清洁, 门窗密封安装空调或除尘设备。
- ◆入室前更换工作服等, 避免将杂菌带入。
- ◆具备安全设施如干粉灭火器等。
- ◆制订实验操作与安全管理制度和运行机制
- ◆超净工作台应一字摆放, 间隔适当, 避免相互干扰, 导致污染或引致安全事故。



(三) 组织培养室 (简称组培室或培养室)

1. 基本功能

依据培养对象不同又可分为细胞培养室和组织培养室。接种材料通常放在培养室中培养，使其生长分化。



2. 仪器配置

放置组培架、光照培养箱、电动恒温摇床等。

种类规格多，选用取决于实验性质、工作方便、现有条件等。

玻璃器皿广泛用于植物组织培养。

3. 基本要求

- ◆ 温度可控，一般 25°C ($20\sim 30^{\circ}\text{C}$)，因植物种类而异。用空调控制。



◆光照可控，光源一般为白色日光灯。

光照强度 (lx)、光质、光照周期 (h/d) 应是可调的。光周期采用自动定时器控制。暗培养可设暗培养室或使用暗箱。



- ◆湿度可控，除湿机. 加湿器. 空调. 放置水盆等。

相对湿度70%~80%为宜，低于50%时应增加湿度，避免培养基变干。湿度高，室内空气含菌量及墙面. 地面. 物品表面附着菌量增加易导致污染。

- ◆具备必要消毒条件。可采取物理的或化学的消毒方法。



(四) 温 室 (大 棚)

1. 基本功能

用于栽培实验材料如实验材料前处理、组
培苗的栽培和快速繁殖等。

2. 设施配置

栽培设施、供电供暖、供水设施
光照设施、实验设备、防盗防火
防病虫害等设施。



3. 基本要求

- ◆设施齐备, 安装科学, 安全实用。
- ◆较大有效使用面积, 内部布局科学合理, 方便操作管理。
- ◆良好自然采光和人工光照条件。光. 温. 气. 水. 湿等生态因子皆可调控
- ◆必要消毒处理设施。
- ◆建立健全温室使用与安全操作制度。



(五) 精密仪器室

1. 基本功能

安装大型精密仪器。

2. 仪器配置

高速冷冻离心机, 基因枪, 电子显微镜等。

3. 基本要求

专用电源、保持清洁干燥防止有害化学物质的侵蚀建立健全管理制度落实专人负责制等。



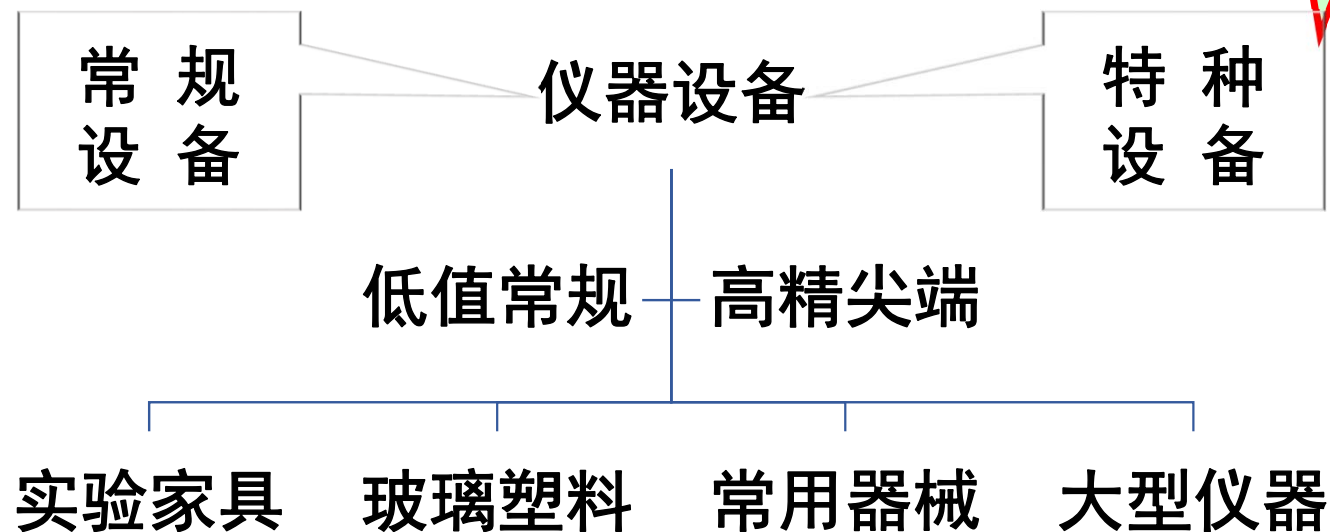
电子显微镜



基因枪 离心机 电子显微镜 电动摇床

二、常用仪器设备

分类讨论
比较复杂



(一) 实验家具类

根据主要功能：

实验台. 药品架. 药品橱. 实验凳. 通风橱. 文件柜. 办公桌椅等。

根据材料性质：

木制. 铝合金玻璃. 人造板材. 钢制玻璃. 铁皮. 塑料等。



(二) 玻璃及塑料制品

三角瓶. 培养皿. 烧杯. 广口瓶. 滴管. 移液管. 量筒. 烧瓶. 玻璃缸. 载玻片. 盖玻片. 玻璃棒. 蒸馏水瓶. 培养瓶. 注射器等。

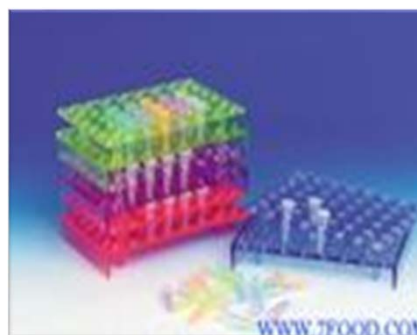
各类器皿型号不同, 刻度精度不同, **用途不同**。

根据色泽分为无色和有色 (棕色等, 后者防光照)。

根据材料质地分为钠玻璃和硅酸盐玻璃, 有的实验只能选用后者。

玻璃塑料制品应用

- ◆药品的制备与存放
- ◆液体定容药品称量
- ◆生物学与化学反应
- ◆生物材料离体培养
- ◆种质材料离体保存
- ◆实验材料的存放
- ◆实验废弃物收集
- ◆过滤、洗涤等



塑料制品的特点

- ◆易加工成型，刻度准确，透明度好，轻便耐用。
- ◆有的能耐一定程度高温，但是，特指湿热灭菌状态，仍不能明火、电炉加热。
- ◆价格较玻璃仪器贵些，但耐用，长期使用比玻璃仪器便宜。
- ◆尽管有的能耐湿热，但是，灭菌装料时仍不能相互挤压，防止因高温导致形变。
- ◆防止利器划伤，避免磨擦降低透明度影响使用。
- ◆严禁购买使用假冒伪劣商品，严防实验事故。

- 塑料制品如培养皿. 试剂瓶. 枪头. 滴管. 量筒. 烧杯等刻度准确，加工精细。
- 有的塑料制品耐热性差，不耐高温高压，质地脆硬，透明度差，易受损，不宜用于实验
- 一般应选用耐高温高压. 不宜破碎. 经久耐用. 透明度好. 量化刻度准确. 对实验无不良影响的塑料制品。
- 即便是耐高温塑料制品，也不能直接加热而仅限于类似高压蒸汽灭菌环境中使用。

(三) 常用实验器械

1. 镊子类

医疗常用镊子，其中枪式镊子接种使用比较方便。
植物材料较小，采用尖头镊子为宜。



2. 解剖刀

常用有两种：**固定式和活动式。**

后者可经常更新刀片而保持刀片锋利，尽量避免切割对周围组织挤压损伤。



●3. 剪刀类

根据实际需要在医疗器械中选用各种剪刀如大剪刀、小剪刀和弯头剪刀。



4. 接种针(环)

在较长手柄先端，安有金丝或镍丝，可以用来转移细胞或愈伤组织、农杆菌接种培养等。



5. 细菌过滤器

培养基中含有高温易破坏物质时可使用细菌过滤器过滤除菌，细菌过滤器有漏斗型、注射器型两种。

常用漏斗型过滤器中 5号砂芯玻璃漏斗可以除去大部分细菌6 号砂芯玻璃漏斗可以除去全部细菌。

对于较大量的溶液进行过滤除菌时，可以在漏斗下安装流水泵或真空泵进行抽气以提高过滤速度。

注射器型过滤器

在注射器先端安装一个过滤装置通过加压进行过滤。

前者可用于大量除菌后者可用于少量的溶液除菌(如植物生长调节物质的除菌)。





6. 注射器

常用的注射器型号大小不等, 质地不同, 有玻璃的塑料的和不锈钢的. 主要用于过滤混合等操作。



7. 牙签

常用小不点工具, 用来挑取样品与实验材料、辅助取材、工艺品制作牙签质地不同: 木质、塑料、骨质、淀粉的, 有尖头和扁头 (可自己加工), 根据具体情况选用。



●8. 刀及刀片

单面和双面，有普通钢和碳钢的。主要用于切割实验材料，辅助取材。



●9. 橡皮筋

捆扎实验材料、实验用品等。

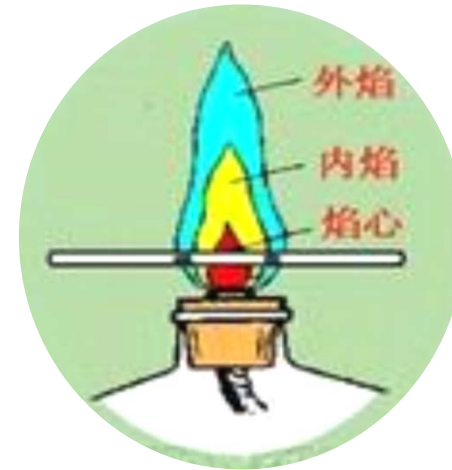
长时间或反复高温处理强度和弹性会下降，易断裂。



10. 酒精灯

用于器械等消毒，完成无菌操作。

酒精喷灯用于物体加热（如加热玻璃管以弯曲或拉长，制作滴管等）。



11. 打火机(或火柴)

主要用于点燃酒精灯或其它实验操作。



●12. 记号笔

观察记录, 玻璃器具, 各种标识牌作标记, 绘图等。



(四) 大型仪器设备

种类多，涉及
较多工作领域

选择不同角度
分类结果不同

无菌操作设备
组织培养设备
冷冻冷藏设备
观察分析设备
测试分析设备
其它设备

- 1. 无菌操作设备

超净工作台、高压蒸汽灭菌锅和电热干燥箱等。

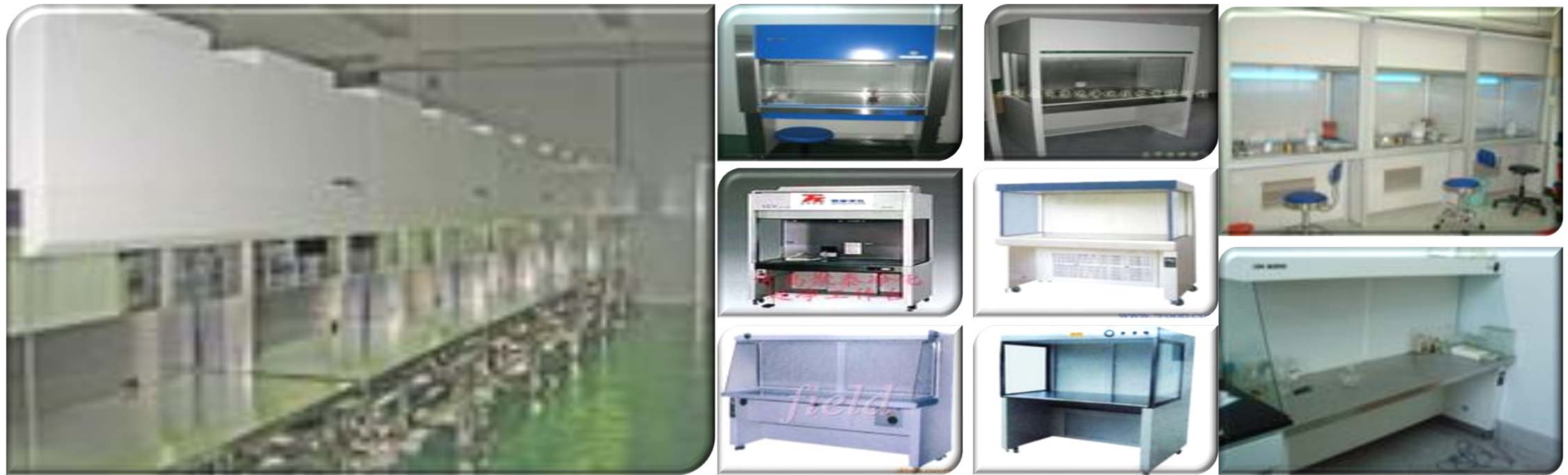
- ①超净工作台

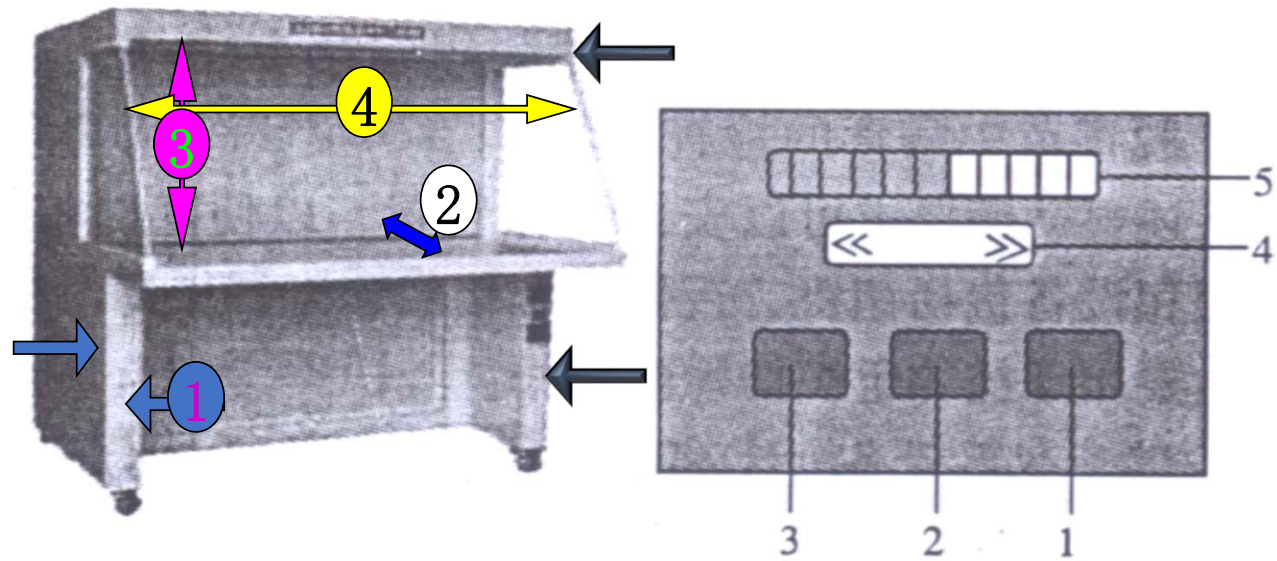
超净工作台主要由鼓风机、过滤板、操作台、紫外灯和照明灯等部分组成。



一般植物组织培养，可以采用水平式或垂直式超净工作台。

遗传转化操作和农杆菌、大肠杆菌的接种时，最好采用垂直风幕式超净工作台，避免细菌在空气中扩散。





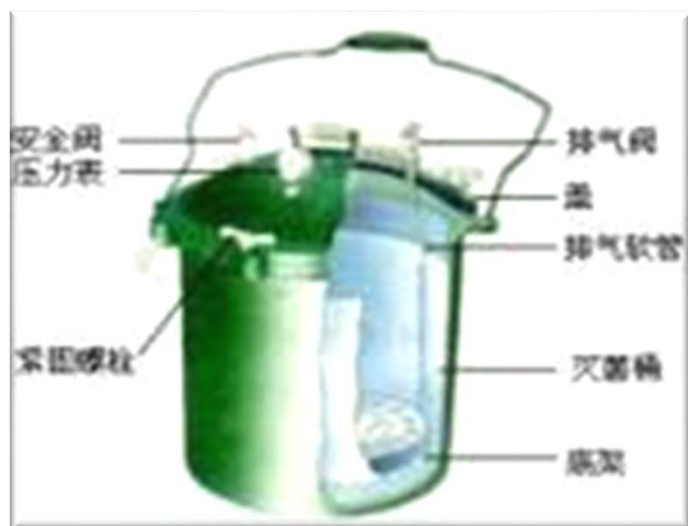
1. 电源总开关 2. 紫外灯开关
3. 照明灯开关 4. 风控制开关 5. 风量显示

超净工作台示意图

• ②高压蒸汽灭菌锅

培养基、蒸馏水和各种器械的灭菌消毒，有大型、中型和小型三种。

实验室常用中型立式全自动灭菌锅和小型便携式灭菌锅，大型卧式高压蒸汽灭菌锅在工厂化植物组织培养上使用。





高压蒸汽灭菌锅属于压力容器, 其设计、制造、运输、使用管理必须严格遵守国家相关法律法规!

图 2-4 高压蒸汽灭菌锅

●③电热干燥箱

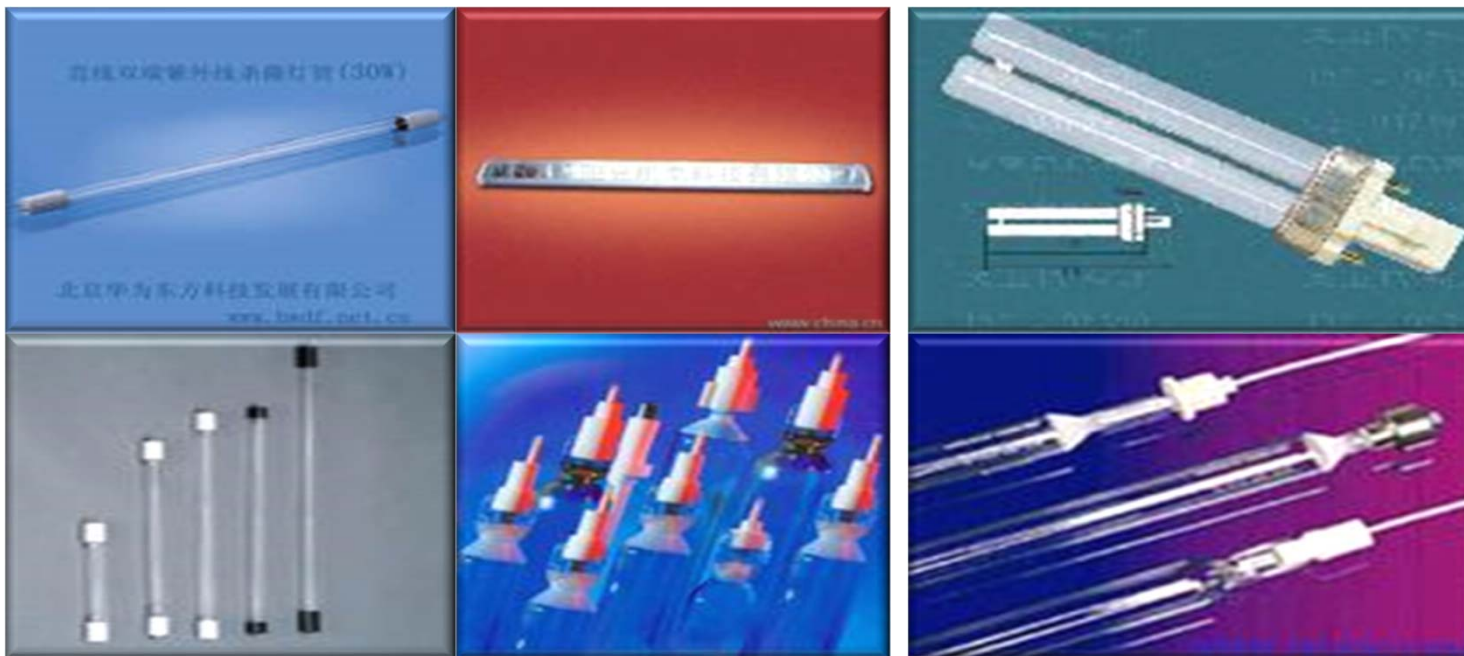
亦称烘箱，玻璃器皿等器具洗净后，必要时可用烘箱进行干热灭菌（150℃，1～3h）如只进行后烘干可设置在80℃左右。还有电热培养箱。



专用电源设备, 远离易燃易爆易挥发等危险品!

●④紫外线灯

超净工作台、室内环境灭菌。如无菌操作室、手术室、食堂等公共场所。



●2. 培养设备

创造适宜光温水气等条件，包括空调，加湿器或去湿机，定时器，培养架，光照培养箱，人工智能气候箱，电动恒温摇床等。

①空调设备

室内温度控制，保持室内清洁及调整湿度。



●②加湿器和去湿机

改善培养室内湿度状况。室内相对湿度大，引致污染加重；过于干燥培养物易失水影响培养。



● ③ 定时器

调整控制光照时间, 光质, 光照强度等。



- ④组织培养架(又称组培架或培养架)

- *长度根据所采用日光灯长度来确定。

- *高度以4~5层为宜。

- *每层高40cm左右。

- *宽度约40cm。

- *用于放置培养物, 培养架的**高度、宽度、深度、层间高度**应根据实际需要而定。

- 层面可安装平板玻璃或铁丝网，增加光线的透射量，使培养物可同时接受来自不同方向的光照。
- 用铁丝网分隔时，光照效果虽然不如玻璃板但热量扩散效果好。
- 用玻璃作为隔板时光照效果好，但有时会造成局部温度过高。培养架有木质、铝合金、不锈钢的等，每层安装有日光灯。
- 如果灯管散热多，灯管和架子上层玻璃隔板之间应安装隔热层，避免上层摆放的培养物底部受热，影响生长。

为防止灯光造成的热气在培养架各层间聚集，在每一层的一端可安装一个小风扇。

开启可统一自动调控。

三角瓶、培养皿、培养瓶等可直接置于培养架的玻璃隔板上。

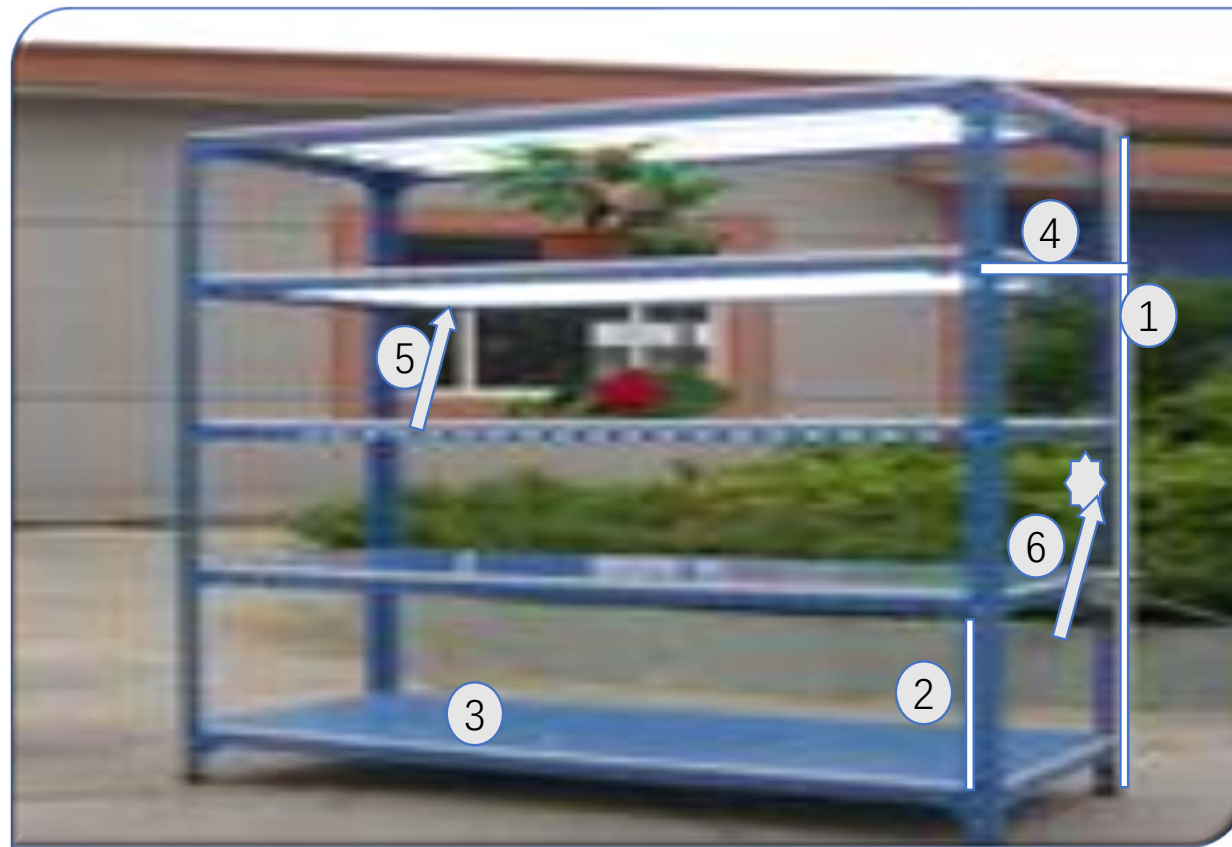
或者，先将其放在适当的盘子内，再将盘子放置于培养架的玻璃隔板上。

试管类容器需用试管架或其他支持物做有效的支持保护，才能放稳当。

培养架要有明确的统一编号或标识，按计划使用。

- 放置培养物，要有适宜密度和详细标记，可直接标记于培养瓶上，或挂牌注明必要的实验细节或内容(如植物名称、外植体, 培养基, 培养时间与条件、所有者等)。





1. 组培架高度 2. 层间高度 3. 长度 4. 深度 5. 日光灯 6. 小电风扇

组织培养架结构示意图

- ⑤**电动恒温摇床**

根据制动方式可分水平振荡摇床和旋转摇床两类。

常用来进行液体培养或某些生化方面实验，改善氧气供应状况等。

水平振荡摇床 做水平往复式振荡，振荡速度可调节，一般100~120次/min为宜。

旋转摇床 做360°旋转，通常1rpm为宜，转速可调以满足实验需要。

多样性 摇床规格、型号多种多样，生产厂家多，不同产品性能有较大差异。

形状差异 主要有立式的和卧式的。

夹持方式 摇床载物台，固定物品方式有两种：铁夹（即铁爪）和弹簧。铁爪有多种规格和样式，质地为合金的，大小不一，可夹持50ml~500ml三角瓶。

弹簧纵横十字交错，形成一个又一个方格空，将三角瓶置于其中，依靠弹簧弹力来固定之。

电动恒温摇床



- ⑥光照培养箱

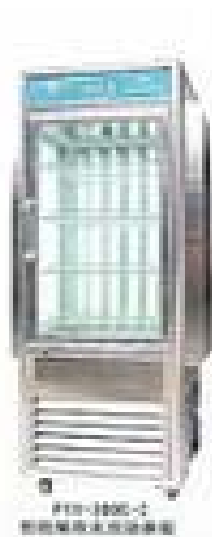
- 可以自动控制温度、湿度和光照条件，用于植物组织培养和组培苗驯化。

- ⑦人工智能气候箱

各项因子完全人工智能控制，调控能力强精度高，可进行自然生态系统的模拟。



光照培养箱



人工智能气候箱

- 3. 冷藏冷冻仪器设备

- ①电冰箱

用于培养基母液贮藏植物材料和植物切片材料的保存，可采用实验室专用冰箱或家庭用冰箱。



②冷藏箱

用于药剂及各种溶液的短时间保存。如各种母液保存等。温度一般设定在 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 。



- ③低温冰箱及超低温冰柜

- 用于实验材料的低温保存或超低温长期保存。常见有 -20°C 低温冰箱和 -80°C 的超低温冰柜。
- 若需要更低的温度，可用液氮处理。



- ④液氮罐

- 内装液氮，可达 -196°C 的超低温状态，用于对实验材料的长期保存。





常压容器——液氮罐

●4. 观察分析仪器

在植物组织培养中，要观察和记录培养物的形态和解剖学变化，进行生理生化方面的测定等确定器官分化与形态建成过程，需要进行显微观察、显微摄影以及组织切片等。

常用的仪器设备应能满足实验的需要。

①体视显微镜

用于植物组织形态分化的实体观察，不定芽、不定胚的早期识别，植物茎尖的切取等工作。常用体视显微镜的放大倍数一般在5~80倍之间。

②普通光学显微镜

多用于植物组织切片的观察，以此来确定植物发育的进程，如不定芽、不定胚及其他组织和器官的分化等。

③倒置显微镜

主要用于细胞和原生质体的观察、细胞分裂与细胞团形成过程的确定。

④荧光显微镜

可用于花粉发芽和原生质体的活力测定。

⑤电子显微镜

在植物组织培养中用得较少，可用于细胞内各种细胞器变化过程观察、脱毒苗中病毒的检查等。

⑥血球计数板

用于培养细胞或原生质体等微观样品的计数。

●5. 测试分析仪器

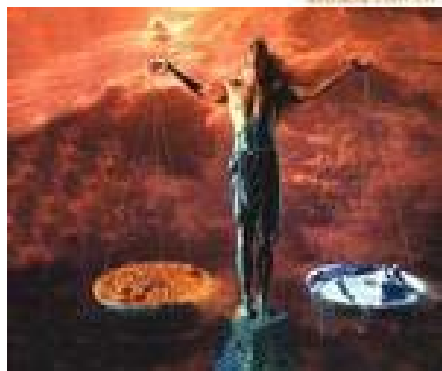
①**酸度计** 即pH计，植物组织培养培养基pH调整很重要。用pH试纸不够准确，最好用酸度计。酸度计用前应先校正，用后电极应很好冲洗，将电极保存在专用缓冲液中。



- ②天平 规格多，精确度也不一样，应根据需要而定，较常用的为普通天平 ($1/100\text{g}$, $1/10\text{g}$)。在微量元素、植物激素等的称量时，需用分析天平，常用的有 $1/1000\text{g}$ 、 $1/10000\text{g}$ 天平的使用操作要严格规范，以确保其性能和准确称量。

现在最常用的是电子天平。





- ③离心机 进行原生质体分离时，需用离心机。进行分子生物学实验时，则需要高速冷冻离心机。



廊坊汇通机械



离心机根据转速可分为低速台式离心机，高速离心机和超高速离心机，以及特种离心机. 根据应用情况可分为工业用离心机和实验科研用离心机. 离心机生产厂家多, 型号多性能差别大, 分别适合于不同工作要求。



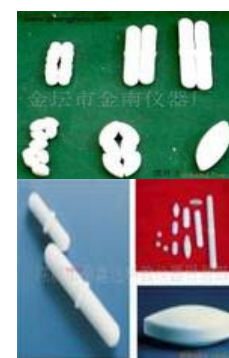
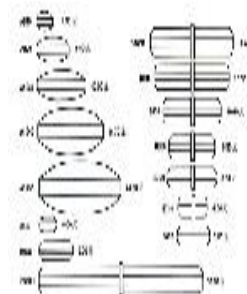
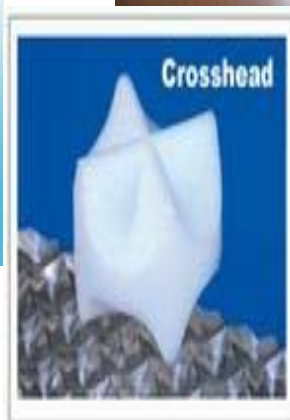
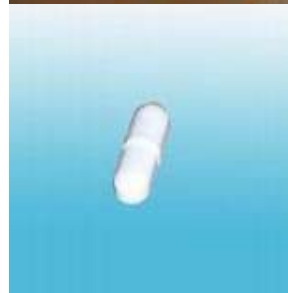
●6. 其它仪器设备

①**电热磁力搅拌器** 具搅拌与加热双重功能，用于辅助溶解化学药品等。





电
动
磁
力
搅
拌
器



磁力搅拌棒

- ②蒸馏水装置 有蒸馏型和离子交换型两种。需要时，还可进行重蒸馏来获得纯度更高的蒸馏水。
- ③重蒸水装置 用于制备重蒸水。





纯净水装置



- ④**微波炉** (电磁炉、电炉)

用于融化琼脂或培养基等，加热各种物质。



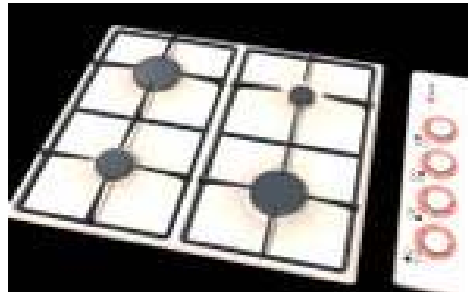
微波
炉



电磁炉等



电炉子



- ⑤真空泵 用于辅助抽气、过滤除菌，如各种维生素、激素等溶液的过滤除菌，实验材料预处理。

真
空
泵



- ⑥水浴锅

- 用于调控实验温度，保温，恒温。



水浴锅

- ⑦移液器

- 用于准确量取。转移溶液，准确滴加样品等。

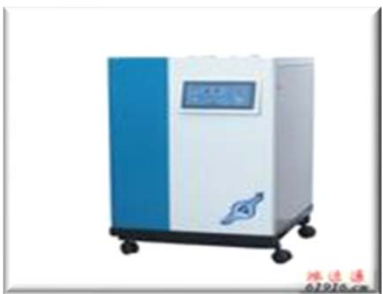


移
液
器



●⑧超声波处理装置

用于清洗实验用具与器皿。



第2节 基本实验操作技术

◆洗涤干燥

◆药品制备

◆无菌操作

◆灭菌消毒

- 掌握实验技术是实验成功关键。
- 工作量大，要求责任心强，严格按照程序操作，保证质量。
- 玻璃或塑料器皿、磁力搅拌棒、剪刀、镊子等需经常清洗。
- 旧的或新购置的器皿和器具只有彻底清洗之后才能使用。

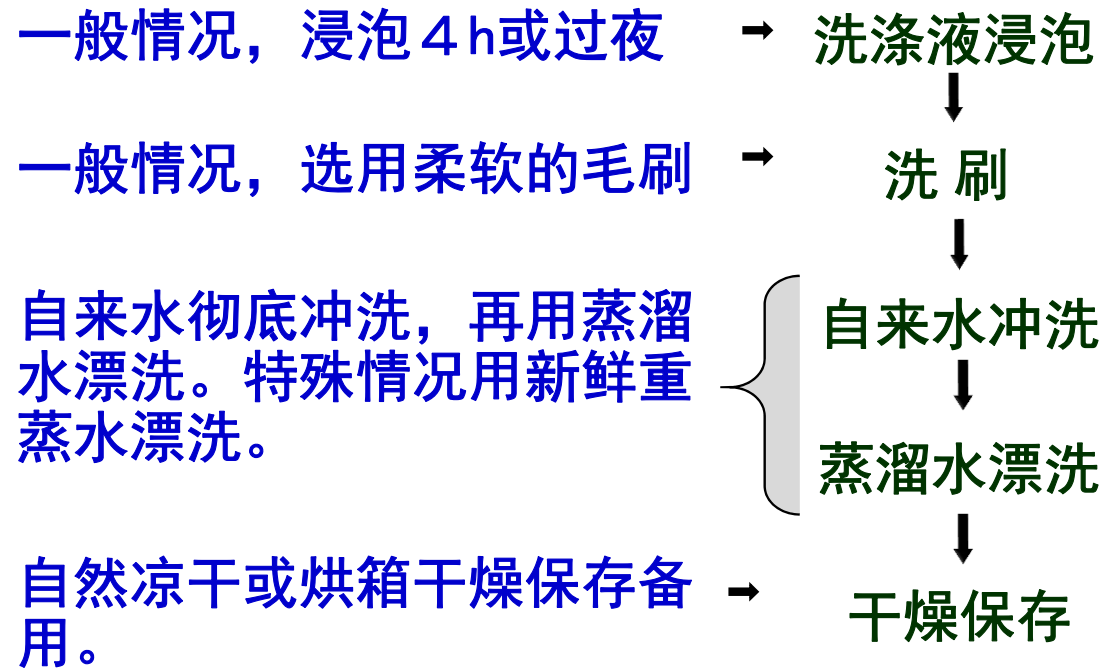
一、常用的洗涤技术

(一) 常用的洗涤剂

- 肥皂粉、餐洗净、洗衣粉、洗洁精、重铬酸钾洗液、酸、碱、氧化剂等。
- 重铬酸钾洗液氧化腐蚀作用极强，洗净力极好。



(二) 洗涤一般程序



(三) 常用洗涤方法

- ◆ 清水洗涤
- ◆ 洗涤剂洗涤
- ◆ 超声波洗涤
- ◆ 重铬酸钾洗液洗涤
- ◆ 其它洗涤方法



清水洗涤

● 1. 洗液洗涤法

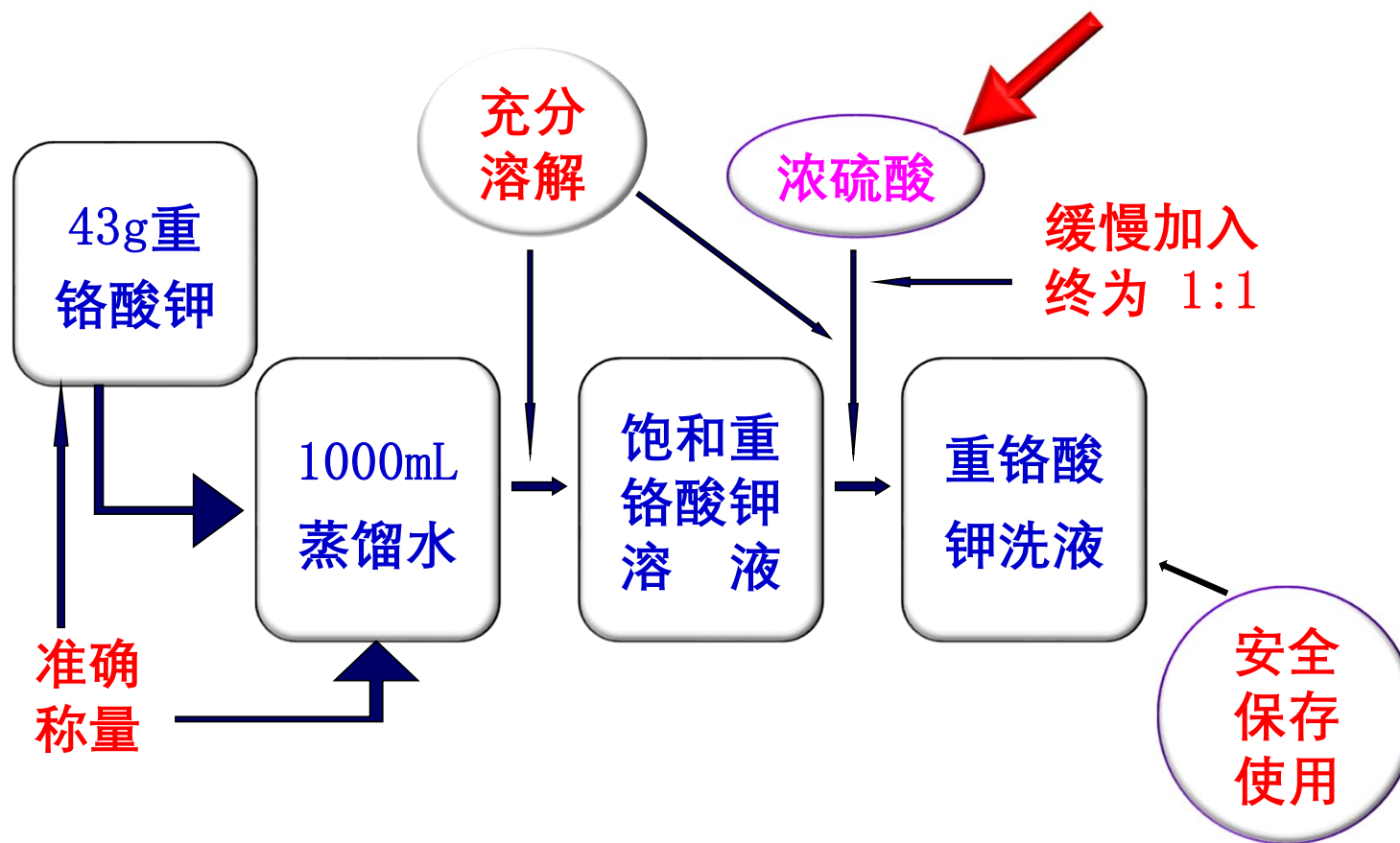
① 洗液的配制

→ 将43g重铬酸钾溶于1000ml蒸馏水中 (在20℃时可以达到饱和状态) 制成重铬酸钾饱和水溶液。

→ 然后将浓硫酸缓慢加入到重铬酸钾饱和水溶液中，最终使重铬酸钾饱和水溶液与浓硫酸比例达到1:1。

注意事项

配制过程中只能把浓硫酸缓慢加入重铬酸钾溶液中绝不能将重铬酸钾饱和液倒入浓硫酸溶液中，因会产生大量热量而来不及扩散，从而引起浓硫酸溅出。



重铬酸钾洗液配制流程图

- ②洗涤操作

玻璃器皿在用洗液浸泡前，先用水洗净晾干后再用洗液浸泡一夜，取出用自来水冲洗再用蒸馏水洗两次(用蒸馏水洗器皿时一定要少量多次)，干燥后备用。



```
graph TD; A[自来水洗涤] --> B[干燥]; B --> C[洗液浸泡]; C --> D[取出]; D --> E[自来水冲洗]; E --> F[蒸馏水漂洗]; F --> G[干燥备用];
```

自来水洗涤
↓
干燥
↓
洗液浸泡
↓
取出
↓
自来水冲洗
↓
蒸馏水漂洗
↓
干燥备用

- 较小的玻璃制品，可在大烧杯中重铬酸钾洗液浸泡，然后自来水和蒸馏水冲洗。
- 移液管等先用自来水冲洗，然后放在特制的防腐不锈钢网筒内，在重铬酸钾洗液中浸泡一夜，再将网筒放在虹吸式自动冲洗装置中，用自来水冲洗数十次，最后用蒸馏水冲洗，干燥后备用。

- **2. 洗涤剂法**

重铬酸钾洗液中铬离子会造成环境污染。

普通无磷中性洗涤剂是一种理想的选择。

- **3. 超声波法**

一种物理方法，对环境没有污染。

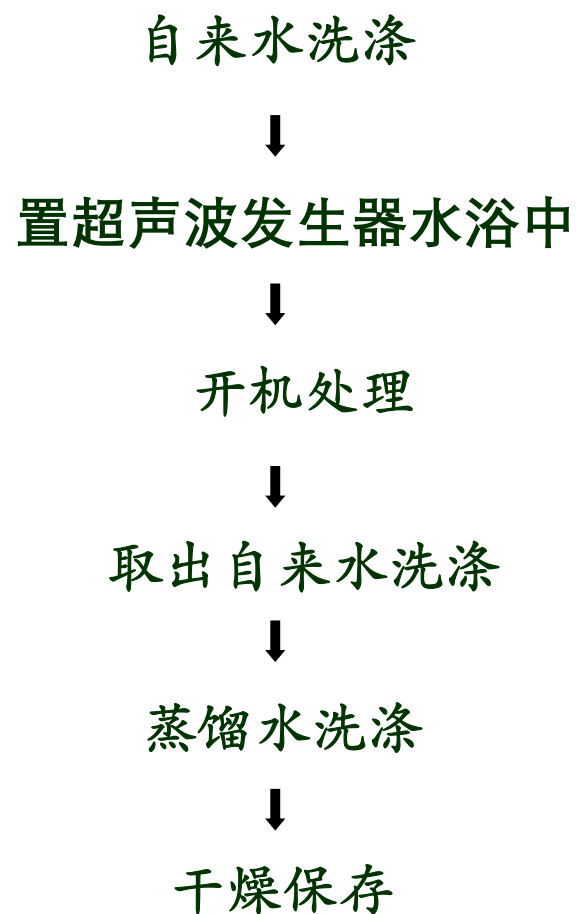
对比较顽固的污垢十分有效。

超声波发生器容量有限，常用来清洗较小器皿。

具体方法如下：

- 将需要清洗的玻璃制品放在超声波洗净器内，注入自来水，设定时间，然后超声波处理。

将处理后的玻璃制品用自来水冲洗再用蒸馏水冲洗。干燥保存备用。



(四) 玻璃器皿清洗

①新购置玻璃器皿

常带有游离的碱性物质先用 1%稀盐酸浸泡，用肥皂水洗净，清水冲洗，再用蒸馏水冲洗，烘干备用。

1%稀盐酸浸泡



自来水冲洗



洗涤剂浸泡



自来水冲洗



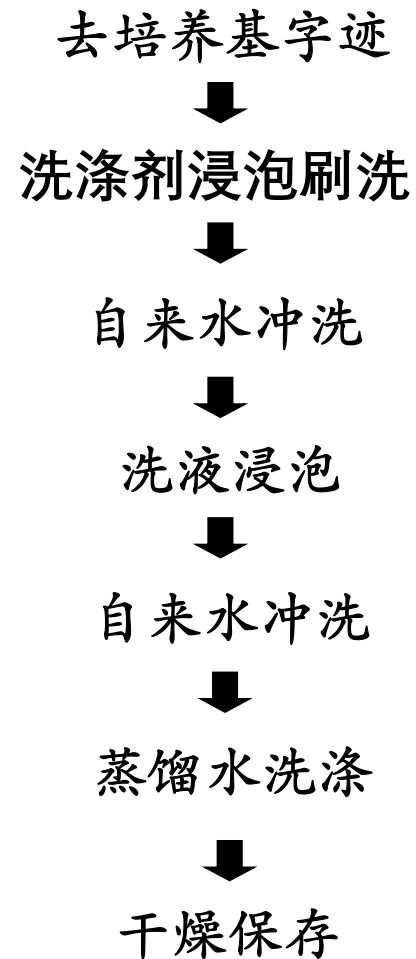
蒸馏水洗涤



干燥保存

- ②已用过的器皿

- 先将字迹培养基除去，再用洗涤剂溶液浸泡，再用刷子刷洗，自来水冲洗洗液浸泡，自来水冲洗最后用蒸馏水冲洗，干燥保存。



- ③较脏的玻璃器皿

可先用洗衣粉或洗洁精刷洗并冲净后，再浸入洗涤液中适当浸泡洗涤。

- ④在洗涤液中浸泡的时间

一般视器皿脏的程度而定。

- ⑤用过的吸管和滴管等

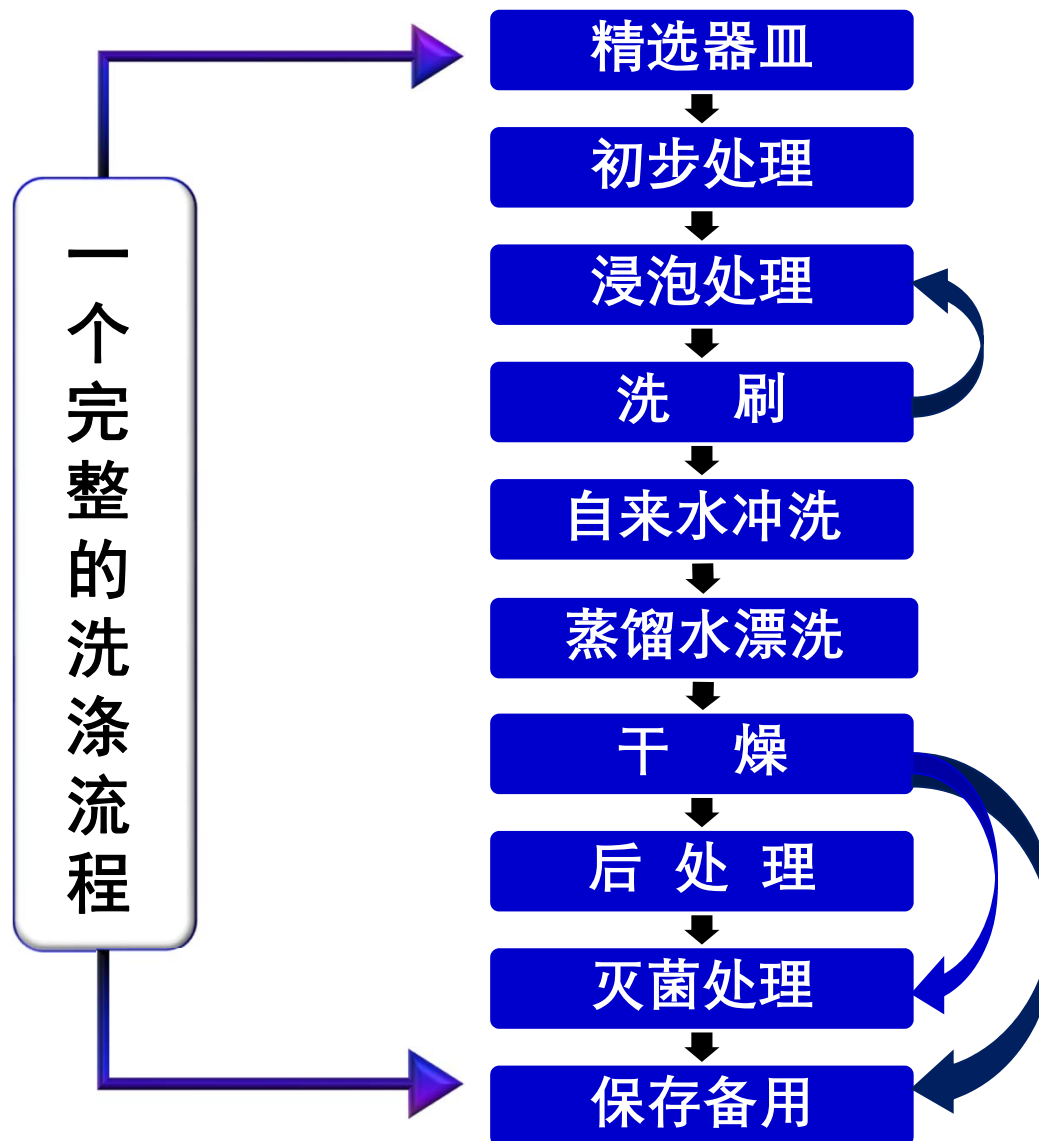
应放洗涤液中浸泡2h以上，取出自来水冲洗干净，再用蒸馏水冲洗1次，置烘箱中烘干或晾干。

- ⑥被霉菌等污染的玻璃器皿

必须经高压蒸汽灭菌，用洗涤剂刷去污染物，用水冲洗干净后，浸泡在重铬酸钾洗涤液中，2h后取出，自来水冲洗干净，再用蒸馏水冲洗，烘干备用。

- → 切忌被杂菌污染的器皿直接水洗，避免造成环境污染。
- → 洗净的玻璃器皿应透明发亮，内外壁水膜均匀，不挂水珠。
- → 各种器械如剪刀、镊子、刀片、刀柄、解剖针、牙签等使用前也要彻底清洗。
- → 洗净的器具，应妥善保存，以免再次发生污染。
- → 长时间放置后，用之前要重新洗涤。

务必严格规范执行实验程序



●1. 精选

- ①质地的选择。
- ②去掉破损者、不配套者。
- ③凡接触过**剧毒、放射性、强致病菌、致癌性**等物质者, 应按照国家有关规定单独处理, 切不可置于大宗器具中!
- ④移液管等特殊器件应特殊化处理。
- ⑤贵重物品、成套器皿需要的话应单独处理, 或对其易损部件单独处理。

●2. 初处理

- ①新购置的器具往往带有较多灰尘、油性污垢、字迹等，要先进行清洗后再浸泡。
- ②旧的器皿往往带有较多灰尘、油性污垢、字迹、水垢、培养基或其它残存物等，要先进行清洗后再浸泡，字迹可用相应的有机溶剂擦拭去掉。
- ③凡带有微生物者，要先进行高温灭菌，初步清洗后再浸泡。

●3. 浸泡

- ①选择适当洗涤剂，主要考虑器皿情况及用途，洗涤剂价格及安全性等。根据具体情况确定洗涤剂的用量或浓度。
- ②在满足洗涤需要前提下，尽量减少浸泡时间。自来水硬度大，浸泡时间长易结水垢，影响器皿的透明度及实验。
- ③器件内外表面都要浸泡充分，有利于刷洗。
- ④使用强酸、强碱、洗液等特殊洗涤剂，要按规范要求操作，确保安全。

●4. 刷洗

- ①浸泡好的器件要由上而下逐次一件一件刷洗，切不可盲目下手沉底捞取器物，防止受伤。
- ②在满足洗涤的前提下，尽量选用较软的毛刷，以免损伤器皿表面。
- ③如动物细胞悬浮培养用的载体，要求表面光滑，如果刷洗造成损伤，则会影响细胞贴壁培养。
- ④器皿的内外表面均要刷洗，在水中有的残留物呈几乎透明状，刷洗要彻底。

●5. 自来水冲洗

- ①上班初次一定要慢慢打开水龙头，刚来的水很可能混浊，水压大，水与气快速射出，导致器皿碰撞倒伏损坏。
- ②器皿的内外表面都要彻底冲洗，特别是口小肚子大的器皿，要耐心细致地反复冲洗。
- ③污染浑浊异常的自来水，不能用来洗涤。

- 6. 蒸馏水漂洗

- ①有自来水的情况下干燥，时间长，器皿表面会结水垢。

- ②蒸馏水漂洗要彻底，内外无遗漏之处。

- 7. 干燥

- 自然晾干或人工干燥。

- 8. 后处理

- ①选取配套器皿

- ②器皿内放置实验需要的用品，如滤纸等。

- ③根据具体情况打包，标记。

●9. 灭菌

- ①高压蒸汽灭菌（即湿热灭菌）。
- ②干热灭菌。

●10. 保存

- ①已灭菌的器皿放置于工作台上干燥后，在妥善保存。
- ②防止再次污染，防止损伤外包装。
- ③长时间放置，用之前要重新灭菌。

二、灭菌的技术



物理灭菌技术：

- ◆ 湿热灭菌
- ◆ 干热灭菌
- ◆ 过滤除菌
- ◆ 紫外线杀菌
- ◆ 辐射杀菌



- 1. 为什么要灭菌？

- ①环境条件

- 培养基营养齐备丰富，含高浓度蔗糖，培养环境特别适宜于微生物的生长繁殖。细菌、真菌一旦接触培养基，生长繁殖速度比植物细胞快得多。

- ②微生物特点

- 微生物快速生长与大量繁殖，大量而快速地消耗培养基中的糖类营养物质，与培养细胞争夺营养，影响培养细胞的正常生长。

- **③恶化环境**

- 快速生长与大量繁殖的微生物，不断地向培养基中排泄对培养材料有毒性的代谢产物，并导致培养基中如pH值等物理与化学因子的改变，进而恶化培养的环境，最终导致培养物死亡。

- **④确保无菌**

- 培养容器内必须保持完全无菌的环境植物组织培养不要与微生物或病理工作共用组织培养区和仪器设备，一旦发现污染，应立即进行灭菌处理。

2. 植物组织培养污染的可能来源

各种因素导致污染的可能性及污染程度视具体情况而定
不同实验引致污染的因素主次不一样，具体问题具体分析。

污染的可能来源

- 培养容器
- 外植体
- 组培器械
- 人为污染
- 培养基
- 室内环境
- 室外环境

(一) 常用器具的灭菌

- ①单独或随培养基、蒸馏水等一起湿热灭菌。
- ②清洗干净，在电热干燥箱中160~180℃干热灭菌。
- ③浸蘸95%乙醇，在酒精灯火焰的外焰上灼烧至发红为止，待冷却后使用。
- ④实验过程中，器械要常灼烧灭菌，效果好。
- ⑤用70%酒精浸泡消毒，效果较好。

- 1. 干热灭菌法

- 1) 干热灭菌法

在**高温、干燥**环境（条件）中消除微生物等。

- 2) 具体做法

将需要灭菌的器具（**玻璃器皿或器械**）先用铝箔包好，放入160~180℃的恒温干燥箱内，保温2h。取出后冷却备用。

- **3) 干热灭菌注意事项**

- **①松紧适宜**

- 干热灭菌时，物品在烘箱内摆放得不能太挤，太挤导致热的空气循环不畅且穿透慢，影响灭菌效果。

- **②禁止干热处理的物品**

- 报纸、滤纸、棉布等易燃易爆物品及化学药品切勿置于烘箱内。

- **③温度与时间设置**

- 在持续160~180℃条件下，灭菌处理般不宜过夜。
- 根据具体情况温度可设置的高些，但不能让干燥箱长时间持续处在高温状态。

- **④高低温交替灭菌**

- 如果必须过夜持续处理，可高低温交替进行，即在夜间适当设置较低温度，白天设置较高温度。
- 具体灭菌处理的温度与时间，应根据实验要求设置。

- **⑤室温开箱**

- 灭菌结束须待烘箱冷却至室温后，方可开门取物。
- 如果温度很高时打开箱门，冷空气就会进入箱内，处于高温状态的玻璃器皿就可能炸裂受损，或受到微生物的污染。

- **⑥正确处理异常情况**

- 要随时检查烘箱状态，观察温度计指示值变化。
- 如果发现烘箱温度很高，失控，切不可打开箱门，而应立即切断电源，让其自然降至室温，也可用干净棉布蘸水后将多余水拧去，擦拭箱体外表，以辅助降温。

- **⑦专用电源**

- 电热干燥箱功率大，须配备专用电源。
- 安装于远离热源、水源及易燃易爆化学药品的地方。

- **⑧醒目警示**

- 处于工作状态的烘箱外，要挂醒目的警示牌包括温度、处理时间、使用者等。

- ⑨防止再污染

- 如果用于 RNA 方面的实验，所有的物品都应在清洗干净后，用至少两层铝箔纸包裹严实，适当提高灭菌温度和时间，确保灭菌效果。
- 灭菌后要严格保存，用前严禁打开包装和接触其他物品，以免被污染。



- **2. 高压蒸汽灭菌**

- 将器皿器械等放在高压锅内，高温灭菌。

- **具体做法**

- 将待灭菌皿具用铝箔或牛皮纸包好，置于灭菌锅内，121℃约20min即可。

- 温度降至室温时，取出灭菌物品冷却待用。

- 不同的灭菌锅使用要求不同(参照说明书操作)。

(二)液体物质的灭菌

配制好的培养基等液体带有各种杂菌，可以分装后再灭菌，或直接盛装在较大容器内灭菌后，再分装。

- 常用高压蒸汽灭菌。
- 灭菌时间与需要灭菌的培养基的量密切相关。

表1 培养基蒸汽灭菌所需要的最少时间 (Biondi和Thorpe, 1981)

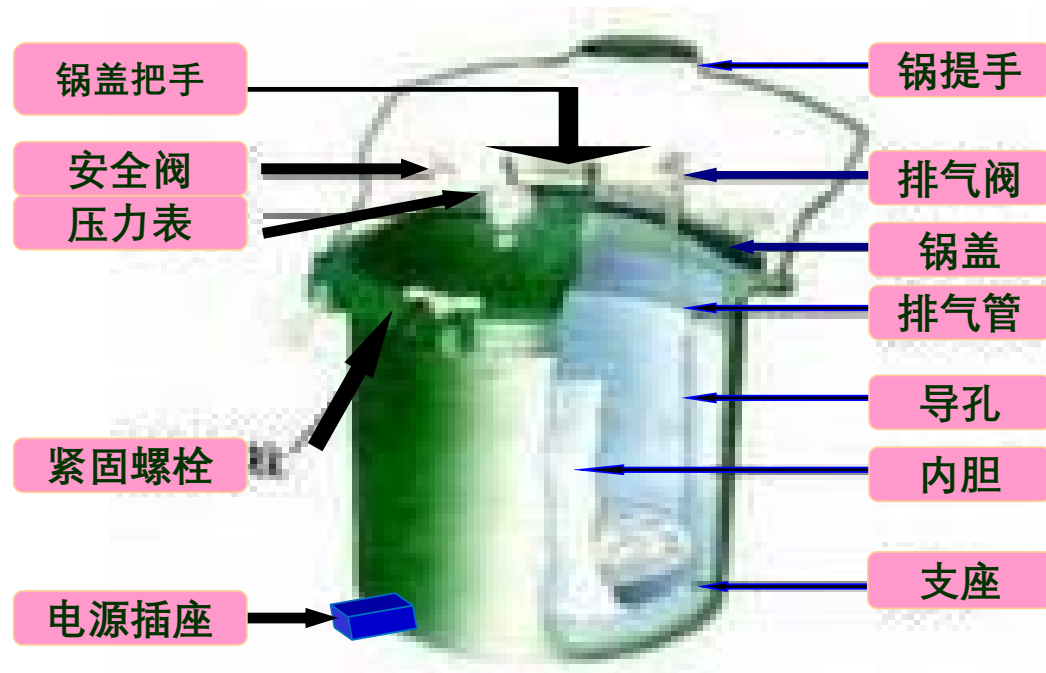
容积/容器 (ml)	121℃下所需最少灭菌时间 (min)
20~50	15
75	20
250~500	25
1 000	30
1 500	35
2 000	40

1. 高压蒸汽灭菌

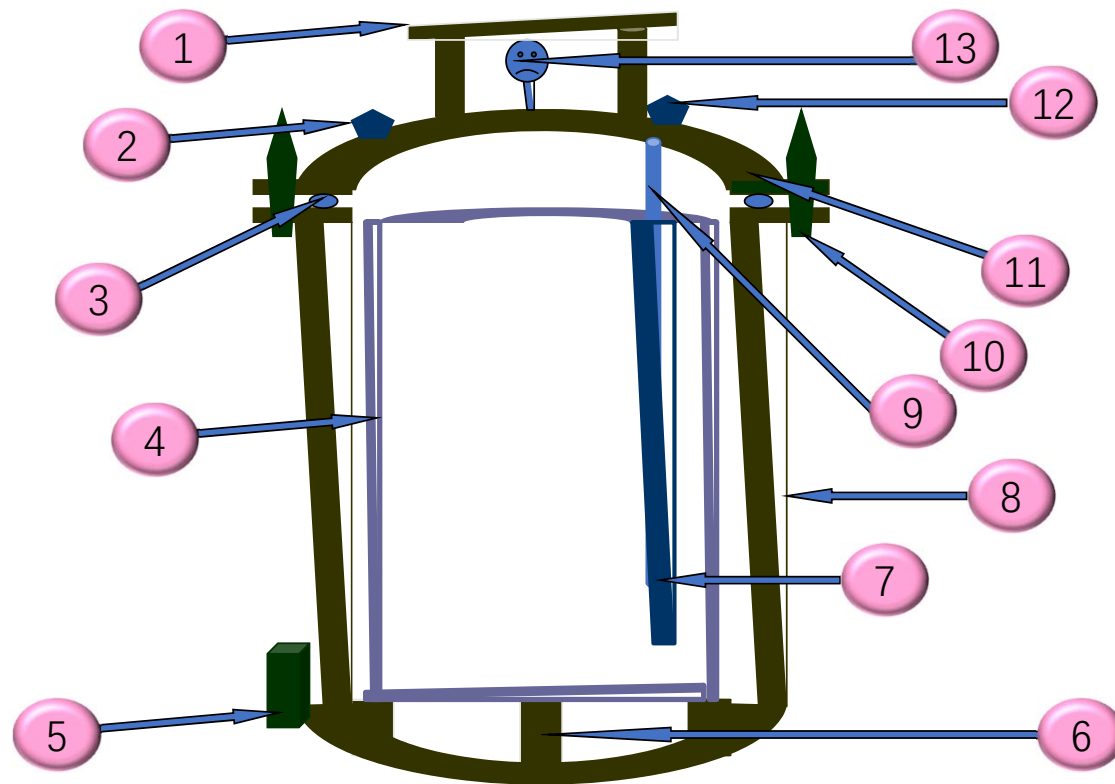
●1) 方法

- 将装有培养基的瓶子瓶口扎紧后，置于高压蒸汽灭菌锅中，在 $1.06\text{kg}/\text{cm}^2$ 的压力下(121°C)消毒处理15~40min即可。
- 灭菌结束，将瓶子取出平放于实验台上，至培养基凝固。
- 未分装的培养基灭菌后，在无菌条件下再分装到无菌器皿。
- 灭菌作用取决于温度而不是直接取决于压力。所需的时间随着要进行消毒的液体的容积而变化。
- 灭菌温度过高、处理时间延长，培养基的物理性质和化学性质会发生变化，不利于组织培养。

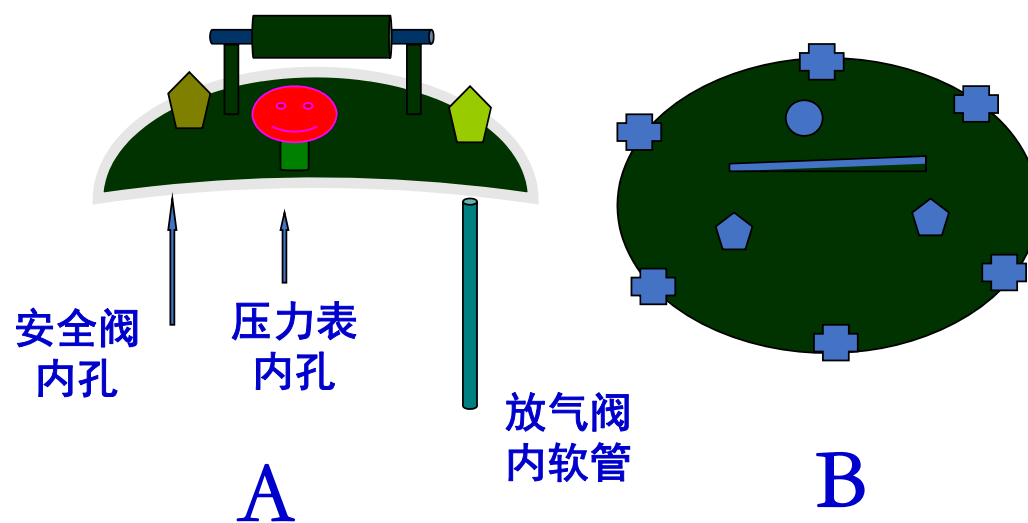
2)手提式高压蒸汽灭菌锅



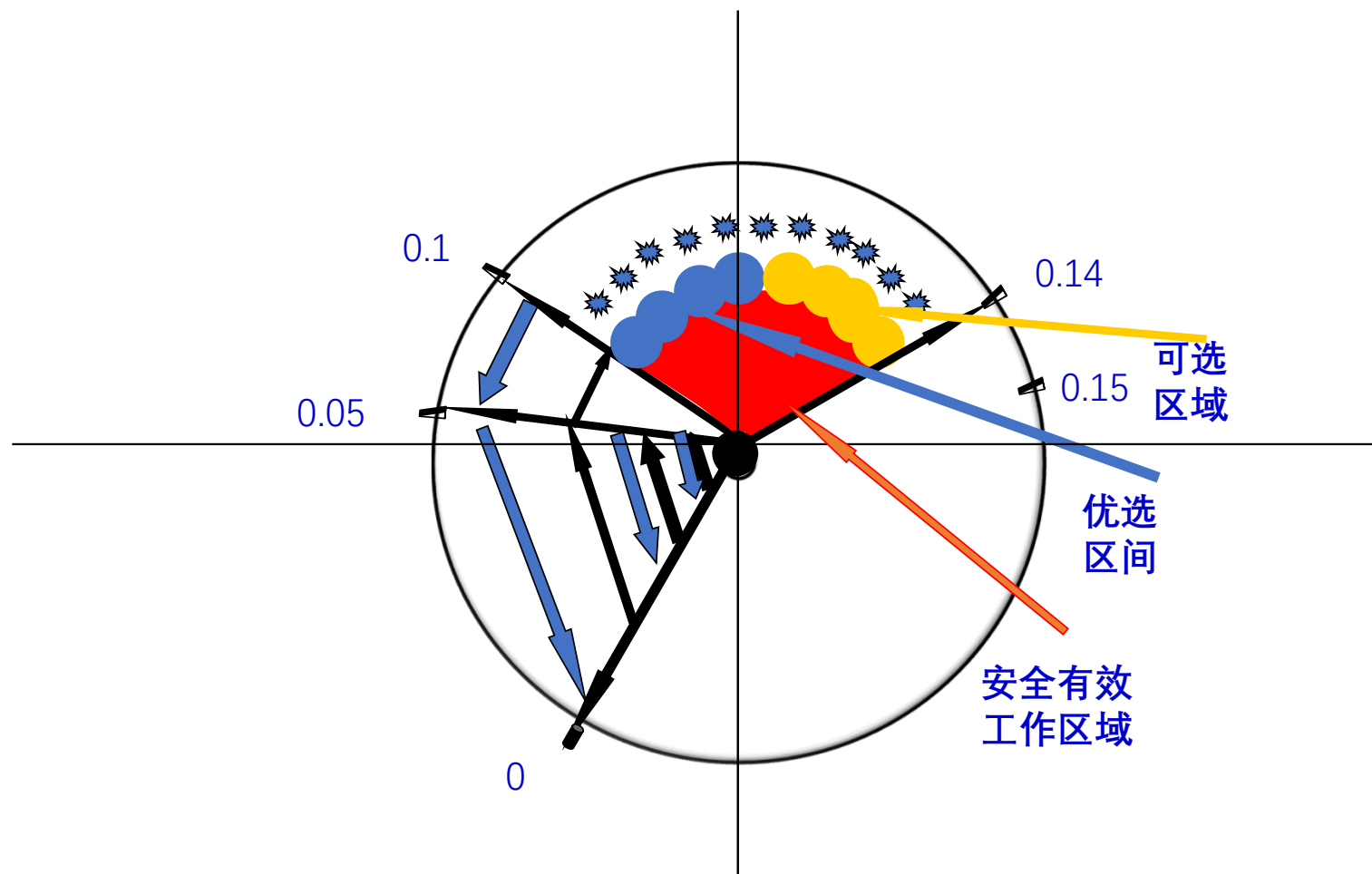
手提式高压蒸汽灭菌锅结构示意图



手提式高压蒸汽灭菌锅纵剖面图



A:侧面视图 B:顶面视图
锅盖结构示意图



压力表图示

● 3) 操作流程

- 装料 将待灭菌的物品装于锅内胆。
- 安全检查 目测锅体、电源等方面的安全性(外观及感觉)。
- 加水 锅内加水到与支座持平。将内胆装与锅内，盖上锅盖，关放气阀。
- 通电加热，指针顺时针由0→0.05刻度。
- 断电，打开放气阀，指针逆时针由0.05 →0刻度。
- 关放气阀，通电加热, 指针顺时针由0 → 0.05刻度。
- 断电，打开放气阀，指针逆时针由0.05 →0刻度。待看到放气阀冒出来全是水蒸汽时，关放气阀。
- 通电加热，指针顺时针由0→0.05刻度→0.1刻度, 开始计时。
- 继续加热, 指针顺时针由0.01~0.14刻度；指针在未到0.14时断电, 指针逆时针由0.14~0.1刻度。
- 指针在未到 0.1时通电，指针顺时针由0.01~0.14刻度……, 如此反复操作，使指针在0.1~0.14之间摆动20min。
- 断电，指针逆时针由0.1→0.05刻度。
- 继续保持该状态，指针逆时针由0.05→0刻度。
- 打开放气阀，待看到放气阀孔无水蒸汽冒出来时，开锅盖，取出物品。

- 4) 注意事项

- ①安全检查

- 高压蒸汽灭菌锅应定期到有关技术与质量检验监督部门进行性能与技术安全检查发现问题及时解决，包括锅体的状况、放气阀与安全阀的性能、压力指示表性能、电源情况等。
- 使用前必须要检查压力锅的性能状况，确保安全

●②调整水位

- 高压蒸汽灭菌锅，用前应添加足够量的水最好是蒸馏水，或清洁的自来水，以免锅内结水垢。
- 加水的量一定要适宜，水位与锅体内底部的三个支柱（支座）齐平即可。
- 需要及时更换锅内的水，并将锅内刷洗干净，保持水的卫生。
- 如果加水太多，过多的水还会进入锅的内胆，浸湿灭菌物品，放气时会有大量的水从排气阀孔处排出来。
- 如果加水量太少，随着多次排气操作和锅的不断排气，致使锅内水量不足，甚至于造成干烧锅现象，极易引起实验事故。

- ③保持锅体卫生

- 经常更换锅内的水，及时除去水垢，及时清理放气阀、压力表、安全阀的内侧，除去异物，防止异物堵塞阀孔，保持清洁。

- ④科学装料

- 锅内灭菌物品不宜装得太满，不宜挤压得太紧，以免影响热循环，达不到灭菌要求。
- 防止 (如塑料纸等)堵塞安全阀和压力表内孔，引致实验事故。

- **⑤正确降温操作**

- 当所灭菌的物品是液体时，冷却降温操作应十分小心。
- 如果压力急速下降，超过了温度下降的速度，就会使液体滚沸，从容器中溢出来。
- 装样量一般为容积的 $1/3$ ，最多不能超过 $1/2$ 。
- 灭菌后在气压表归零之前不要打开锅盖，以免发生危险和培养基等液体外溅现象。

- ⑥放气开锅

- 灭菌结束后，待压力表指针归零，打开放气阀，阀孔无水蒸汽冒出时，方可拧开螺栓，开锅取物

- ⑦灭菌处理的温度和时间

- 应根据实验的需要和灭菌物品的性质等因素来确定。如果是液体的还要考虑其体积的大小，体积大者，灭菌时间应适当延长。
- 如果是培养基等化学溶液，则应在满足实验对灭菌要求的情况下，尽量采取较低的温度和较短的时间。

- 长时间或反复的高温处理，会引起培养基等化学成分的改变，引起物理性质和化学性质的变化，如糖类物质被碳化、pH值的改变、培养基凝固性的改变等。
- 经长时间的高温处理或反复的高温处理的培养基，颜色会变深，并难以凝固，不宜用于组织培养。
- 如果是蒸馏水、玻璃仪器、其他器械等，则可采取较高的温度和较长的时间，以提高灭菌的效果。

- ⑧ 准确把握灭菌理时间

- 以压力表的指针顺时针到达0.1刻度、逆时针回到0.1刻度作为灭菌处理时间计算的起始点、终止点。

- ⑨ 不宜高温处理的物质

- 某些生长调节物质 (如GA3、玉米素、ABA等)、尿素、某些维生素等，遇热易分解，不能进行高压蒸汽灭菌，但可过滤灭菌。

●⑩专用电源

- 高压蒸汽灭菌锅功率大，要用专用电源，安装在安全地方，远离易燃、易爆等危险物品。
- 要防止锅体压住电缆，引起安全事故。
- 除人工智能全自动高压蒸汽灭菌锅外，工作期间，人员不能擅自离岗。
- 通电加热升温后，如果发现锅盖处漏汽，则应断电后，打开锅盖，清理密封圈，并将锅盖转换一定的角度，重新盖上。
- 在对热的锅体实施操作时，为避免烫伤，应垫上干燥棉质的抹布或毛巾而不能用湿的。

- 在盖上锅盖时，应将螺栓的位置调整准确，在盖上锅盖和打开锅盖时，应以对称形式、均匀用力拧紧或打开螺栓，以防止锅体发生形变。
- 如发现密封圈老化，则应及时更换新的。
- 如果灭菌的是液体物质，则当压力表指针逆时针回到0.05刻度时，最好仍让锅体自然降到室温，一般不要立即操作放气阀，以免液体外溢。
- 如果灭菌的不是液体物质，则当压力表指针逆时针回到0.05刻度时，可操作放气阀，缓慢辅助放气，使压力尽快回到0，可缩短实验的时间。
- 空气的热传导能力远低于热的水蒸汽，灭菌开始时，一定要排除锅内的冷空气，确保锅内热循环的畅通，提高灭菌效果。

- 2. 过滤除菌

- 1) 应用

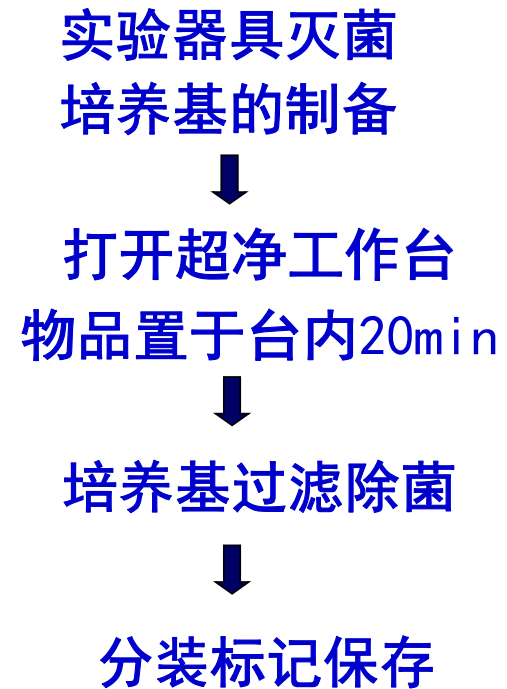
- 当培养基中含有高温下易分解或变性的物质时，如生长调节物质、酶等可采用过滤法除菌。

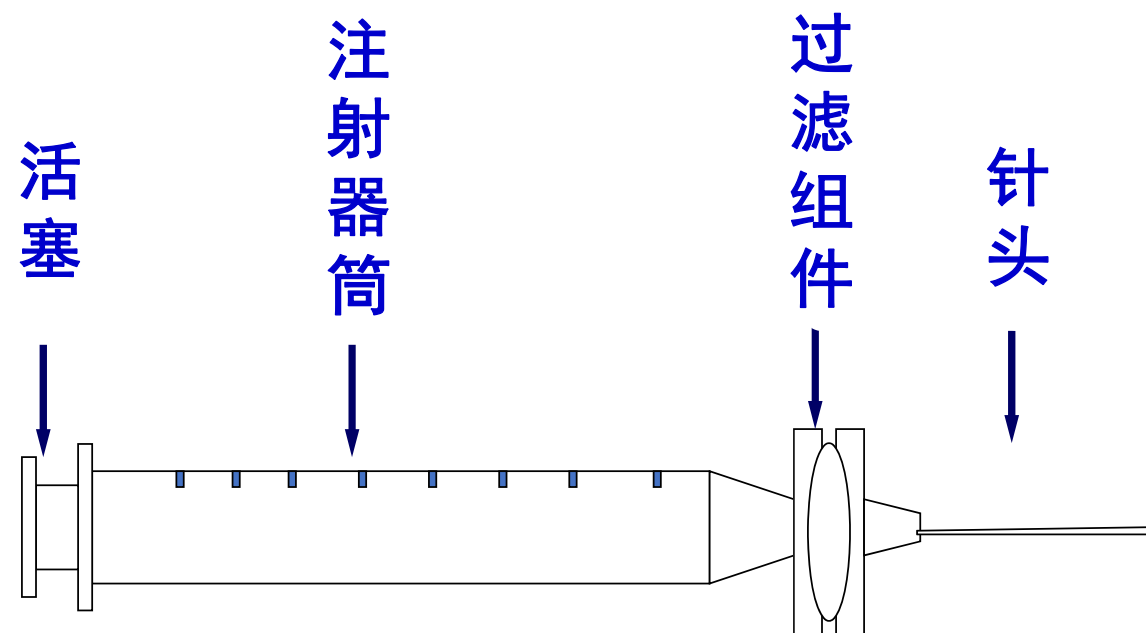
- 2) 特点(与高压灭菌方法相比)

- 过滤除菌操作麻烦，有时效果不如高压灭菌，但是可以确保有机添加物不被破坏。

●3) 操作步骤

- ①将实验器具灭菌。
 - ②进行培养基过滤除菌操作
 - ③除菌后培养基要在超净工作台内分装。
- ②和③应在无菌环境进行，分装用器具应提前灭菌。





注射式微孔过滤组件

- 3. 部分除菌法

- 1) 操作步骤

- ① 先将高温下易破坏的有机成分配成水溶液，进行过滤除菌后放在超净工作台内。
- ② 培养基中的其他成分按正常方法配制并进行高温灭菌。
- ③ 将二者在超净工作台内配合、定容后分装。

- **2) 注意事项**

- 操作过程中所需器具都是无菌的。
- 如果要制备的是固体培养基，则应在培养基凝固之前 (约40℃) 加入，并且要充分混合均匀。
- 如果要制备的是液体培养基，则可待其冷却至室温时再加入，然后充分混合均匀。

- **3) 滤膜的选择与灭菌**

- 可用孔径不大于0.45um细菌滤膜。
- 将滤膜安在适当大小的支座上，用铝箔包裹起来，或装入一个大小合适的带螺丝盖的玻璃瓶内，高压蒸汽灭菌。
- 过滤器的灭菌温度不宜超过121℃。
- 购置的商品过滤膜皆为无菌包装，开封即可用。

●4) 注射式过滤操作

- 把滤膜安装到过滤装置(组件)内。
- 将液体倒进注射器筒内，安装上活塞。
- 把装有待灭菌液体的带刻度注射器(不必消毒)安装上无菌过滤器组件。
- 缓慢推动活塞，使溶液由过滤组件前端直接滴入培养基，或先加入无菌玻璃瓶中，再用无菌移液管或移液枪加到培养基中。

- **5) 大量溶液过滤除菌**

- 过滤组件规格多，如果要对大量溶液进行过滤除菌，应选用大的过滤组件，在操作之前，先将溶液通过0.65um细菌滤膜初滤，减少对0.45um细菌滤膜的堵塞，使过滤灭菌顺利进行。
- 对于含大颗粒杂质或杂质含量较多的液体也该如此。

三、无菌操作技术

- 组织培养操作必须在无菌条件下进行，防止任何污染，超净工作台是必需设备，其性能直接影响无菌操作效果。
- 无菌操作室除定期熏蒸灭菌外，还要经常通过紫外灯灭菌。
- 在具体的实验操作时，灭菌需要用酒精棉或酒精喷壶来进行（酒精浓度为70%）。

- 1. 超净工作台

- 1) 工作原理

超净工作台内有一架电风扇，鼓动空气先穿过粗过滤网滤去大的尘埃，再穿过细过滤器滤掉大于0.3 μ m的颗粒；此时，微生物亦被过滤除掉，获得洁净空气。

这种不带细菌真菌的超净空气吹过台面上所有空间区域，吹出空气的速度约为27m/min，足以避免来自工作台以外环境的污染，使工作台面上区域保持完全无菌或带菌量极低的状态，而这种气流不会妨碍在台面上使用酒精灯及其他实验操作。

●2) 购置

- ①生产厂家及品牌、规格型号。
- ②是否有人用过或正在使用、情况如何等。
- ③经费情况, 预安装地点, 工作性质等。

●3) 安装

环境空间较大, 干燥清洁, 环境尘多过滤器很快堵塞, 失去过滤作用, 造成污染, 影响过滤器使用寿命。

●4) 使用与维护

- ①新购置或长时间没使用的，用之前要彻底清洗消毒处理，并空开机一定的时间。
- ②经常用或刚用过的，提前15～20min开机即可，同时把有关物品置于台面内，开紫外线灯。
- ③要定期清洗或更换过滤器，检查工作台面上的风速。风速不能太小，太小不能确保无菌环境；风速亦不能太大，太大时酒精等火焰易跳跃，若5～6档风速设计，一般置2～3档即可。
- ④保持环境卫生。
- ⑤超净工作台面上常安装紫外线灯，辅助杀菌。注意安全，工作时须关紫外线灯。

●2. 无菌操作步骤

- ①实验前20min，打开超净工作台及紫外灯，置于有关物品灭菌。
- ②用酒精棉将超净工作台消毒。在操作前手和小臂也要用70%酒精消毒，实验器具用酒精消毒之后，放在超净工作台面上待用。
- ③点燃超净工作台上的酒精灯，在植入或移植材料的前后，培养瓶瓶口须在酒精灯火焰上烧烤灭菌。
- 使用的镊子、解剖刀等用90%酒精浸泡，之后放在酒精灯上燃烧灭菌，再放在灭菌支架上冷却后使用。

● 3. 无菌操作注意事项

- ①在初次使用新购置的超净工作台，或使用已长时间未用的超净工作台时，应在开机20~30min后再开始操作；连续使用时，等待10~15min即可。
- ②在每次操作之前，要把实验材料和所用的器械、药品等先置于工作台内，开机并打开紫外线灯照射一段时间，切勿中途拿进拿出。
- ③注意紫外线灯。

- ④超净工作台面上放置的东西不能太多，不能堆得太高，以致挡住气流。
- ⑤超净工作台面上切勿放置太多的易燃易爆物品如酒精、棉球、报纸等。
- ⑥在点燃酒精灯之后，切勿喷洒酒精消毒，避免引起火灾。
- ⑦操作时人体要离开台面，切勿将头部及胸部前探入台面内，切勿面向工作台用力喘气或大声讲话。
- ⑧已消毒的手及器具亦不要离开台面，确保无菌操作。

- 4. 植物材料消毒处理

- 1) 植物体带菌特点

- 植物尤其是来源于野外的植物体表面易附带灰尘及其它杂物，携带着各种微生物，用来取材之前必须进行彻底的清洗，取外植体接种之前必须表面消毒。
- 来源于野外的植物往往体内带菌，凡内部已受到细菌、真菌等微生物感染的组织，一般不能用作外植体。

●2) 常用的消毒剂

①常用的消毒剂及消毒方法比较多。次氯酸钠和次氯酸钙溶液适用于大多数情况且效果较好。乙醇、升汞等也常用。

②切勿使用甲醇。

③消毒剂对细胞和组织有毒，应正确选择消毒剂、使用浓度、处理时间等，减少对组织的损伤。

●3) 不同外植体的消毒处理

- 如果外植体较硬较大，便于操作，可直接用消毒剂处理。
- 如果是未成熟的幼胚、胚乳等，可先将种子、子房表面消毒，在无菌条件下取出外植体，可使幼嫩的外植体免受消毒剂的伤害。
- 如果是幼嫩的茎尖或花粉粒，须把茎芽或花蕾进行表面消毒，然后，在无菌条件下取出外植体。

- 消毒处理前将植物材料在70%酒精中浸泡片刻(一般不超过10s), 或在消毒液里加入表面活性剂(tween-20或tween-80, 浓度小于0.1%), 提高灭菌效果。
- 消毒处理后, 须用无菌水将材料漂洗3~5次, 以去掉所有残留的消毒剂。
- 如果植物材料表面污染严重, 则应先用自来水冲洗干净, 再进行消毒处理, 或先通过种子培养得到无菌种苗, 然后取其根、茎、叶等为外植体建立组织培养体系。

- 5. 植物组织无菌操作流程

- ①准备工作

- 准备工作内容很多，主要是实验植物材料的栽培与管理。
- 一般用于组培的植物应栽培于人工可控制的环境之中，易于控制其生长和病虫害，有益于获得适合于组织培养的外植体。
- 田间生长的植株受微生物侵染严重，可在取材之前施用内吸性杀菌剂，有效降低植株体内带菌量或使其不带菌。

- ②预处理

- 将植物组织材料用自来水彻底冲洗，除去表面附着物。

- ③消毒

- 将清洗后的材料，取适当大小的块状，置于烧杯适当大小的容器内；材料数量不能太多，体积也不能太大，以免影响消毒操作。
- 在超净工作台上，注入含有活化剂的浓度适宜的消毒液，并使之完全浸没植物材料期间应轻摇动2~3次。

- ④材料漂洗

- 消毒完毕，立即倒出消毒液，注入适当量的无菌水(要没过实验材料)，不断摇动，处理2~3min，然后将水倒出，如此重复操作3~5次。
- 也可将材料取出，依次置于无菌水中，充分洗涤3~5次。

- ⑤器具消毒

- 可提前完成，也可在材料消毒处理的同时完成。
- 在操作过程中，剪刀、镊子、解剖刀等要随时消毒，蘸95%酒精于酒精灯火焰的外焰上灼烧至发红，待冷却后使用。
- 可在超净工作台上缓慢自然冷却，也可插入无菌水中快速冷却。

- ⑥切取外植体

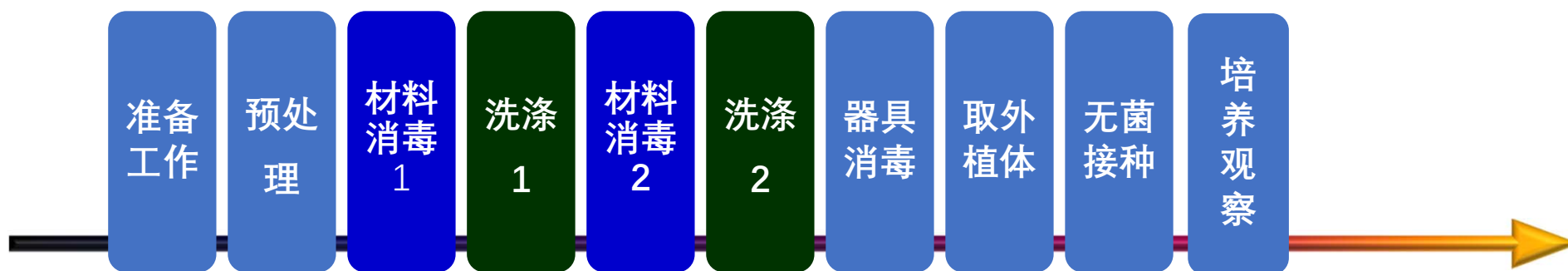
- 在超净工作台上，使用无菌的器具(如剪刀、镊子、解剖刀、解剖针、体视显微镜等)从已表面消毒的材料上切取外植体，如从较大的茎芽上切取茎尖外植体。
- 外植体的大小、形状、数量以及其它的具体要求，要根据实验而定。

- ⑦接种

- 将外植体接种于适当的培养基上然后将培养容器封口、标记后置于光照培养箱中或组培室的组培架上进行培养。
- 如果使用玻璃三角瓶、培养瓶等，接种前后，都应将瓶口置于酒精灯火焰的外焰上烧烤片刻，冷却后再封口，减少污染。

- ⑧培养

- 可以选择人工气候箱、光照培养箱或组织培养架等。
- 调整温度、光照、湿度等各种生态因子以满足培养的需要。
- 培养物要以适当的间隔摆放，做好标记。
- 确保培养环境清洁。



植物组织无菌操作技术流程

四、药品的制备技术

●1. 药品制备操作

①仪器设备的准备

- 电子天平. 电冰箱. pH计. 电动磁力搅拌器等.
- 玻璃或塑料制品, 如烧杯. 量筒. 玻璃棒. 药品匙. 容量瓶. 三角瓶等.
- 其它物品, 如塑料的或纤维纸(封口用). 橡皮筋. 记号笔等.

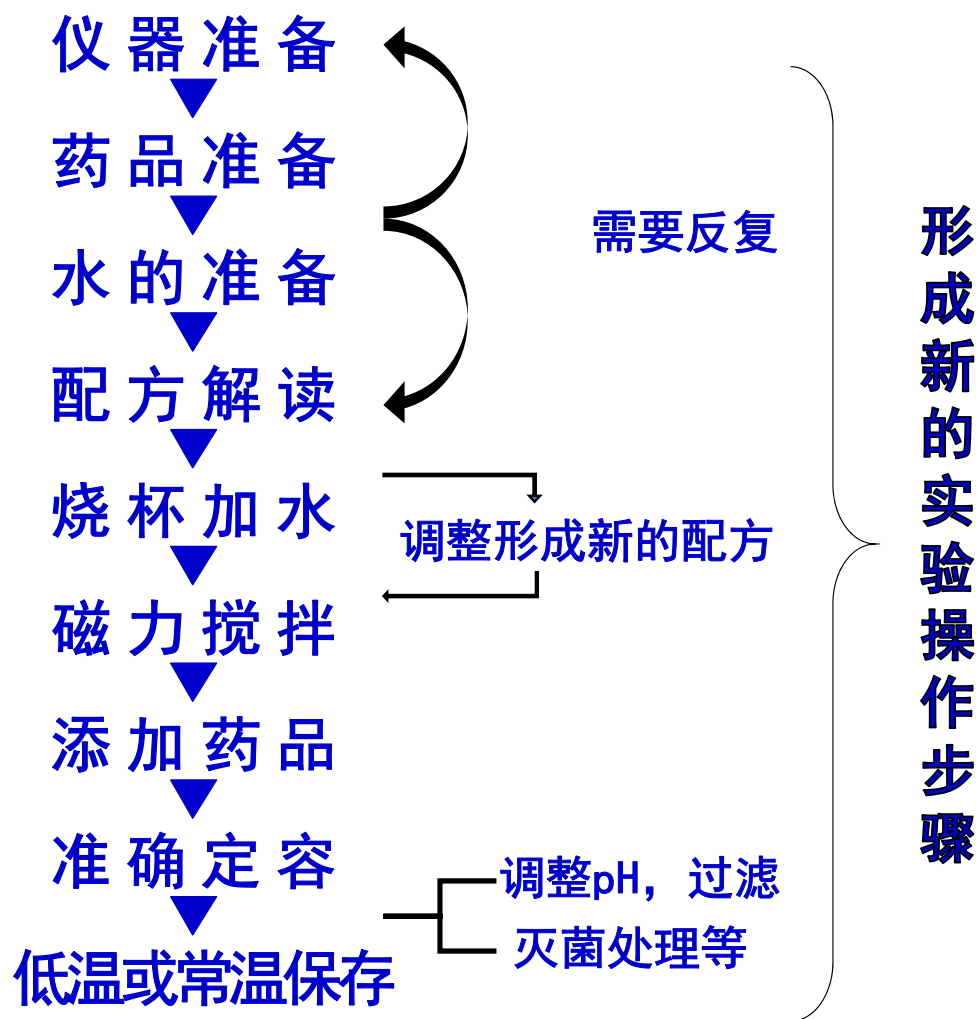
②化学药品准备

依据配方准备相应的化学药品, 以及相关的替代药品, 并确保其质量与数量。

- ③准备足够的蒸馏水或重蒸水，满足需要。
- ④阅读配方。并根据实验室现有条件，将给定的配方转化为可操作的实验方案，以此制订出详细药品配置操作细则。
- ⑤取适当容量烧杯，加入水(初始加水量)。
- ⑥放入磁力搅拌棒，置于电动磁力搅拌器托盘上，开机。
- ⑦按照配方次序，依次准确称量并添加各种成分，并充分搅拌至完全溶解，直到最后一种成分。
- ⑧用量筒定容。
- ⑨倒入试剂瓶，标记，冰箱0~4℃保存。

2. 药品配制流程

一般操作流程



- 3. 注意事项

- 1) 仪器准备工作

- ① 仪器设备的质量，有效称量的范围，称量的精度和准确性，灵敏度。
- ② 生产厂家，品牌，信誉度。
- ③ 安装及使用条件是否得当。
- ④ 玻璃仪器等的质地是否满足要求，试剂凭无色的还是棕色的，规格型号等。
- ⑤ 实验者操作仪器的水平，包括经验及熟练程度等很多方面。

- 2) 药品准备工作

- ①生产厂家. 品牌. 经销商及其信誉. 供货渠道。
- ②商品质量标准. 相关证件, 保质期, 数量是否真实. 禁用不合格药品。
- ③药品指标, 如药品纯度等级(分析纯, 化学纯), 所含杂质的量及种类。
- ④旧的药品的保存期, 保存条件, 这关系到其是否已变质。
- ⑤已开启使用的药品的使用情况, 有无人为污染发生, 是否能满足实验要求而继续使用。
- ⑥缺乏必要标识的, 质量不确定的, 不能用!

●3) 水的准备

- ①一般性洗涤用清洁卫生的自来水即可(你不要认为所有的自来水和地下水都是清洁卫生的! 现在的环境污染太厉害啦. 水在采集输送过程中会发生污染, 有的地下水含有大量的有害成分)。
- ②蒸馏水最好是新制备的, 长时间常规存放会发生变化的。
- ③重蒸水一定要是新制的, 妥善保存, 确保质量。
- ④去离子水(通过离子交换而获得的)并不适用于所有的实验。

● 4) 解读配方

- ①配方来源，是否标准配方，要通过其他途径进一步确定其真实性，配方在传递过程中难免有误。
- ②该配方的适用范围，与同类型配方的差异及其原因。
- ③配方有无特殊要求，如配制操作、药品配备、是否灭菌、特殊的保存条件，特殊的使用要求。
- ④配方是否涉及国家的有关的法律及行业规程，包括仪器设备及管理使用，药品及管理使用。

- ⑤药品本身的信息很重要。
- 剧毒. 易燃易爆. 易挥发. 致癌性. 致病性等。
- 化学性质: 易与哪些物质发生反应而失效或产生危险等。
- 物理性质; 结晶状. 块状固体. 粉末状. 液体. 油性, 水溶性。
- 接受外界刺激的反应情况, 如易爆炸等。
- 过期变质后是否会产生严重危害。
- 假如存在某些方面的危险, 应如何在实验操作过程中加以避免。
- 危险发生后应采取的正确措施, 实验室是否具备安全条件等。

- ⑥配方的理解与转化

现有药品的纯化，去掉有害物质，提高纯度。

替代药品浓度的计算与用量换算。

替代药品有效成分的计算与用量换算。

结晶水的换算。

- ⑦配方的调整优化，科学化，可操作性（药品的溶解特性，是否需要特殊溶剂及溶解方法等，溶解后溶液中离子的存在状态及稳定性等）。
- ⑧据此，全面修订实验方案，使每一个细节都具有可操作性。

- 5) 初始加水

- 计算初始加水量

初始加水量 = 溶液终量 (ml) - 溶质的量 (g+ml)

- 以质量添加者换算成g; 以体积添加者换算成ml.

- 用量筒准确量取并精确添加。

- 初始加水量过多, 溶液终体积将会超标; 初始加水量过少, 在配制过程中, 溶液中总离子浓度会太大, 易产生相互作用;

- **6) 搅拌溶解**

- 搅拌溶解有玻璃棒搅拌和电动磁力搅拌器搅拌两种方式。
- 用玻璃棒搅拌要使玻璃棒沿着烧杯内壁同方向滑动，切忌碰撞烧杯侧壁和杯底，以免损伤烧杯。
- 将烧杯倾斜，让磁力搅拌棒沿内壁缓慢滑入烧杯，切忌自由落体。

- 转速要适当，太快形成旋涡导致大量空气溶入其中，也易引致液体飞溅。
- 有的磁力搅拌器，因长时间使用或老化，控制失灵，开机后就加热，任何药品配制都尽量在常温条件下完成，除非药品本身因素，加热无益处！
- 遇到上述情况时，可暂停一下，用玻璃棒辅助搅拌，待搅拌器托盘冷却后再使用。
- 实验结束，及时清理散落在仪器上实验台上的药品，有的药品极易吸水，引起严重危害。

●7) 添加药品

- 使用电子天平. 量筒. 移液器. 移液管等准确称量各种成分。
- 以适当方式精确添加各种成分。
- 在药品称量时不要交叉污染. 一药一匙, 一药一移液管, 一药一枪头等。
- 严格按照配方次序, 每添加一种药品都要充分搅拌, 使之完全溶解后再加入下一种成分。
- 所有成分添加完毕, 充分搅拌溶解混合均匀。

●8) 定容

- 选用适当量程的量筒(量程不可太大,也不可太小)。
- 量筒放置于实验台面上,确保其水平(一般认为实验台面是水平的)。
- 将经搅拌充分混合均匀的溶液,在玻璃棒的导引下缓慢倒入量筒。
- 用蒸馏水调整液面使之凹液面与量筒相应刻度线持平。
- 将溶液倒回烧杯,搅拌混合,再回倒到量筒,然后再回倒入烧杯,充分混合均匀。

●9) pH调整

- 打开pH计, 提前30min预热并完成校正。
- 将待测溶液置于磁力搅拌器上, 调整速度。
- 取下电极, 拔去保护帽, 蒸馏水冲洗, 滤纸吸去多余水分后, 插入待测溶液中。
- 先测定获得该溶液的基础pH值, 根据其与要调整达到的配方值的差别, 确定添加酸(或碱)以及使用的浓度。

- 一般，先用高浓度，接近配方值时改用低浓度。
- 常见有1N和0.1N的两种酸或碱滴定液。
- 每次滴定后，充分搅拌混合均匀，待读数稳定后，再确定下次操作。
- 不可连续滴加 (尤其是接近配方值时)，造成酸多了加碱，碱多了加酸，严重影响实验，导致操作失败。
- 不能让电极插入空帽中，长时间处于干燥状态！
- 工作环境稳定，现代单极式pH计，经1次标定，可长时间连续性使用，其间不必每一次都校正，但是，其各个功能钮不能调整转动！

- 调整完毕，将电极取出，用蒸馏水彻底冲洗，除去粘带的药品。
- 用滤纸吸去多余水，插入盛有专用电极浸泡缓冲溶液的电极保护帽中。
- 如果发现帽中溶液不足，要及时补充添加！
- 不能用蒸馏水等其他溶液替代专用电极浸泡缓冲溶液！

●10) 保存

- 将配制好的溶液倒入试剂瓶中，做好标记，按配方要求保存。
- 使用中严格管理与操作，防止人为污染。
- 一旦发现污染，沉淀等异常，应弃之。
- 质量没有保证，标识不明确者，不能用于实验研究。

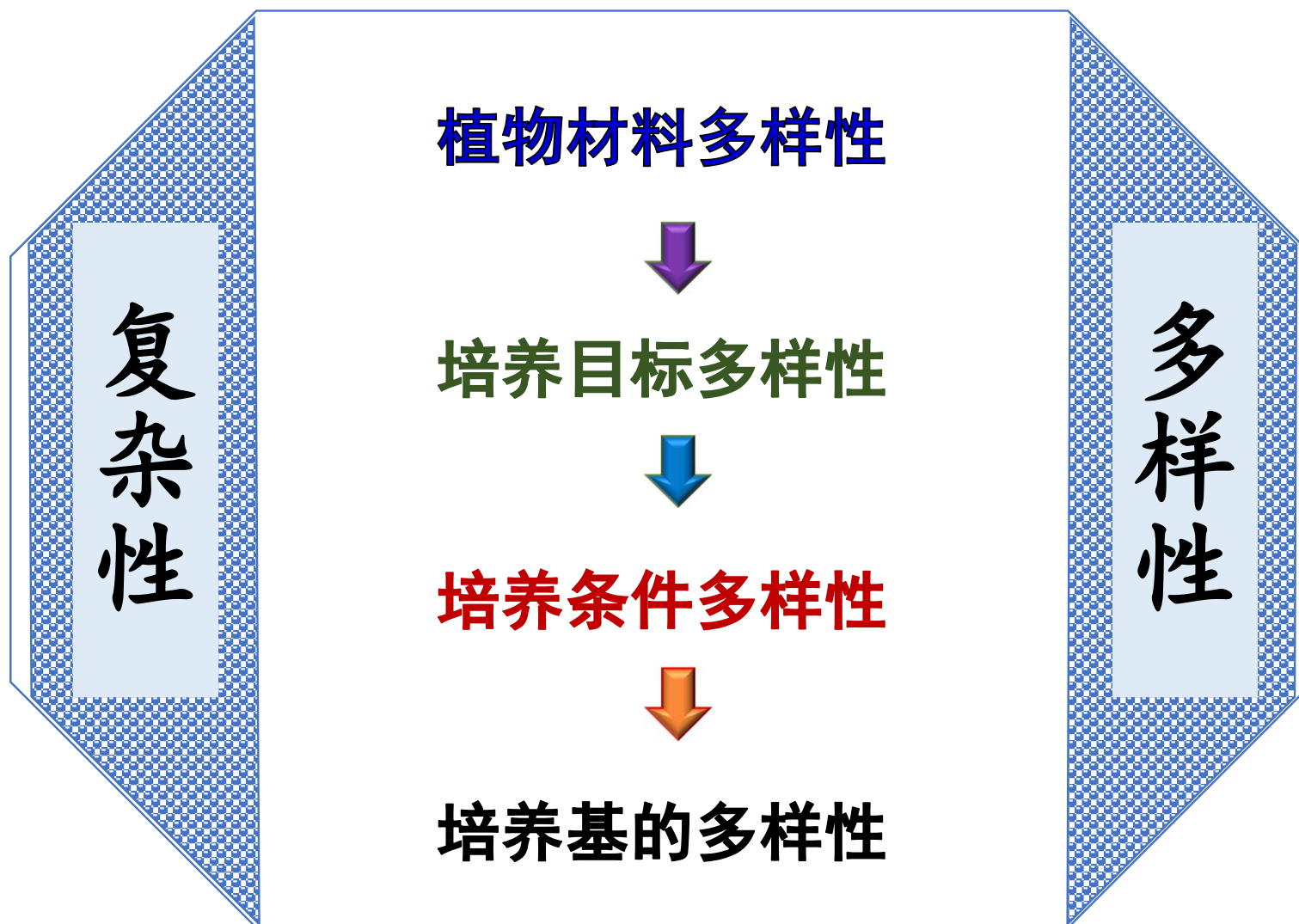
第3节 培养基的基础知识

- 培养基是决定植物组织培养成败的关键因素之一，了解培养基的构成并筛选合适的培养基是极其重要的。
- 1. 培养基的多样性
- 在离体培养条件下：
 - ①不同种植物的细胞、组织与器官等材料对营养及其它生长条件的要求不同。
 - ②同一种植物不同细胞、组织与器官等材料，对营养及其它生长条件要求不同。



- ③同一种植物的细胞、组织与器官等不同层次的材料，对营养及其它生长条件的要求不同。
- ④同一种植物培养材料的不同培养阶段，对营养及其它生长条件的要求不同。
- ⑤没有任何一种培养基能适合一切类型的植物组织与细胞。
- ⑥没有任何一种培养基能适合于实现一切类型的不同培养目标。

- 为满足培养各种植物及其细胞、组织与器官的需要，已研制出多种基本培养基配方，而每一种基本培养基配方经过调整，衍生出多种新培养基。
- 培养基中最为经常调整的一类成分是生长调节物质。
- 培养基的调整并非组织培养调整的全部，而仅仅是一个方面。
- 一个因子的调整，同时必需伴随着其它相关因子的调整，只有各个因子的协调变化，才能实现培养系统的整体优化更新。



●2. 培养基成分浓度的表示

- 培养基各成分浓度一般以质量表示，如g/L、mg/ml、ug/ul。mg/L其含义同P. P. m。
- 也可用克分子量（mole）表示，克分子量等于在一种物质的分子式中以克表示的各个原子重量的总和。
- 1M即1mol/L，表示1升溶液中含有1克分子量的某物质， $1\text{M}=1000\text{ mmol/L}=1000000\text{ umol/L}$ 。
- 一般大量元素和有机物质浓度，可用mmol/L来表示。
- 微量元素、激素、维生素及其它组分的浓度可用umol/L表示。
- 化合物每克分子量中的分子数是恒定的，按照以克分子量值表示的配方配制培养基时，即可利用原来的克分子量值，无须理会化合物中的水分子数。

一、培养基的构成

水分	无机盐类
有机营养成分	植物生长调节物质
天然有机物质	凝固剂
pH	其它物质

- 生长调节物质最为经常调整，其次是维生素、氨基酸。

- 1. 水分

- 1) 水的作用

- ◆水分是一切生物生命活动的物质基础，是生命物质结构的重要组成部分之一。

- ◆水是生化反应和物质运输等生命活动最好的不可替代的介质，一切营养物质在其中解离成相应的离子才能为细胞所吸收。

- ◆水又是很多生物化学反应的原料或代谢产物，参与很多生理生化反应。

- ◆水热容量大，对于调节和稳定生命运动环境的温度十分重要。
- ◆水是一种不可代替的无机溶剂，并且与有机溶剂酒精有很好的互溶性。
- ◆水与其他生命原料物质共同形成具有强大的缓冲能力的缓冲系统，化解外界因子刺激，稳定生命环境。
- ◆水是不可替代的生命环境系统渗透压调节剂。
- ◆生物的生命活动离不开水分，构成培养基的绝大部分组分为水分。

●2) 水的应用

- 实验常用蒸馏水. 重蒸水(高纯水)和去离子水。洁净的自来水只限用于日常洗涤等工作。
- 应根据实验需要选用水。
- 在研究上，常用蒸馏水来配制培养基，而最为理想的水应该是纯水。

- 纯水的制造过程要经过两个步骤：
 - ① 经过蒸馏装置，除去大部分金属离子成分。
 - ② 经过离子交换树脂除去那些与水分一起蒸馏的杂质。
- 高纯水，是将纯水经过再蒸馏而得到的水，在植物组织培养中用得较少。
- 再蒸馏是在亚沸点状态下完成蒸馏的。
- 在生产上，为了降低成本，有时也可以用高质量的自来水代替蒸馏水。
- 自来水含有大量的钙、镁、氯、金属离子和有机物质，最好将自来水煮沸，经过冷却沉淀后，再使用。

• 2. 无机盐类

- 植物生长所必需的无机元素有C、H、O、N、P、S、Ca、K、Mg、Fe、Mn、Cu、Zn、B、Mo 15种元素。
- 前9种元素需要量较大 ($> 0.5\text{mmol} / \text{L}$)，称大量元素。
- 后6种元素需要量较小 ($< 0.5\text{mmol} / \text{L}$)，称微量元素。
- 微量元素 $< 0.5\text{mmol} / \text{L} <$ 大量元素。
- 培养基无机盐类中，根据植物的需要量可以分为大量元素和微量元素。
- 植物从培养基中吸收的大量元素，是构成植物细胞中核酸、蛋白质以及生物膜系统等必不可少的营养元素。

几点说明

- ①各种元素都有其特定的作用：
 - 如：Mg是叶绿素分子的一部分。Ca是细胞壁的组分之一。
 - N是各种氨基酸、维生素、蛋白质、核酸的重要组分。
 - Fe、Zn、Mo是某些酶的重要组分。
- ②植物生长发育所必需的15种元素同样也是组织培养必需的。
- 各种植物组织培养所必需的无机营养元素是相当一致的，差别在于各种盐和离子数量上的不同。
- ③离子是培养基中的活性因子，并非其化合物。
- ④一种类型的离子可由一种以上的盐提供。
 - 如：MS培养基中， NO_3^- 由 NH_4NO_3 或 KNO_3 提供， K^+ 可由 KNO_3 或 KH_2PO_4 提供。

- ⑤一种盐可以提供一种以上类型的离子。

如：MS培养基中， KNO_3 可提供 NO_3^- 和 K^+ 。

- ⑥培养基中的无机盐离子，只有在一定的状态或条件下，并以一定的形式才能被植物细胞吸收。
- ⑦在培养基配制中，如果应用 FeCl_2 来代替 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 。这种形式存在的铁只有在pH5.2左右时，才能被细胞吸收，但在根培养中，接种1周后培养基的pH值会由原来的4.9~5.0上升到5.8~6.0，于是根表现出缺铁症状。

- 在培养基中添加的氮元素可以有两种形态即硝态氮和铵态氮。
- 硝态氮，通常以硝酸铵或硝酸钾的形式添加。
- 在一般情况下， NH_4^+ 浓度过高时对培养物有毒害作用，如烟草在 NH_4NO_3 的用量达到 23mmol/L 时就会发生毒害作用。
- 马铃薯和豌豆的原生质体培养，需要用谷氨酸和丝氨酸等有机氮来代替硝酸铵，以此消除铵态氮的毒害作用。
- 当作为唯一氮源时，硝态氮的作用比铵态氮好，但单独使用硝酸盐时，培养基的pH向碱性方向漂移，如果一并加入少量铵盐则会阻止这种漂移，因此，有的培养基中既有硝酸盐又有铵盐。

- 磷是植物必需的大量元素之一，它不仅在能量的贮存、转化中起作用，而且又是核酸和蛋白质以及细胞膜的主要成分，在许多生理代谢中起着无法替代的作用。
- 在植物组织培养的培养基中，磷以 PO_4^{3-} 形式添加。
- 钾、钙、镁、硫等大量元素也是植物生长分化必需的。
- 钾对细胞渗透压调节起重要作用，对胡萝卜不定胚分化起促进作用。钾在培养基中的大量添加是非常必要的。

- 其他大量元素缺乏，也会影响酶的活性和新陈代谢，从而对组织的生长和分化产生不利的影响。
- 钙、镁、硫等在培养基中的用量不如氮、磷、钾多，添加浓度在1～3mmol/L范围内。
- 培养基中添加的微量元素包括铁(Fe)、锰(Mn)、锌(Zn)、硼(B)、钴(Co)、钼(Mo)、铜(Cu)。
- 在培养基中添加量虽然很少(一般在 $10^{-7} \sim 10^{-5} \text{mol/L}$)，但不可缺少。
- 这些元素是很多酶和辅酶的重要成分，直接影响着蛋白质的活性。
- 铁又是叶绿素的重要组成成分，在没有铁的培养基上生长，组织会产生黄化或死亡现象。

- 铁通常以硫酸亚铁与乙二胺四乙酸二钠 ($\text{Na}_2\text{-DTA}$) 螯合物的形式添加到培养基中，直到pH7.6~8.0时，仍可被植物吸收，否则容易出现沉淀现象。
- 愈伤组织可分泌自然的螯合剂并与铁结合直到pH6.0时仍可利用 FeCl_2 。
- 当某些元素供应不足，或其吸收发生障碍，愈伤组织即表现出相应症状。
- 缺氮素时，某些组织（五叶地棉）表现出一种花色素苷的颜色，也不能形成导管。
- 缺氮、钾或磷时，细胞过度生长，形成层减退。
- 缺硫时，非常明显地褪绿。

- 缺铁时，细胞分裂停止。
- 缺硼时，细胞分裂停滞，细胞伸长。
- 缺锰或钼时，影响细胞伸长。
- 组织培养条件下，缺素症的发生原因：
 - ①培养基中该元素的含量低。
 - ②环境及生理条件不适，如pH、光照、培养基的硬度等。

- **3. 有机营养成分**

- 有机营养成分包括碳源和氮源。

- **①糖类物质**

- 在组织培养中，起初是绿色的组织，在培养过程中会逐渐失去其叶绿素而只依赖外界碳源生活。
- 即使在培养过程中，因某种因素而获得了绿色的组织，也是碳素异养的。

- 在培养基中加入可利用的较合适碳源是十分必要的，能促进培养物的生长。
- 糖是非常重要的有机营养成分。
- 对于植物组织培养中幼小的外植体而言，由于其光合作用的能力较弱，培养基中的糖类物质就成了其生命活动中必不可少的碳源和能源。

- 糖类添加可调节培养基渗透压。
- 常用糖类有蔗糖、葡萄糖、果糖、半乳糖、甘露糖、乳糖和麦芽糖等，其中蔗糖使用最多，其次是葡萄糖、果糖。
- 蔗糖的浓度一般10~50g/L之间(渗透压调节范围在152~415 kPa)，其中以30g/L较多。

- 培养基中有时两种糖类共存时，比单独使用效果好。
- 一般以蔗糖作为碳源时，离体双子叶植物的根生长较好，以右旋糖(葡萄糖)作为碳源时，单子叶植物的根生长较好。
- 红杉属植物和玉米胚乳组织培养可用淀粉。
- 蔗糖在高温灭菌时，会有少部分分解成葡萄糖和果糖。

- ②维生素类

- 多数培养细胞都能合成所有必需的维生素但数量不足，培养基中须补加一种或几种维生素或氨基酸，改善细胞的生长情况。
- 维生素和氨基酸在各种标准培养基中存在很大差异。
- 维生素皆溶于水，唯有叶酸例外，先用少量稀氨水溶解，然后，加蒸馏水定容。
- 植物组培外植体较小而生长较弱，维生素促进其生长分化。

在培养基中常用的维生素

- 维生素B1 (盐酸硫胺素) (VB1)
- 维生素B6 (盐酸吡哆醇) (VB6)
- 维生素B12 (VB12)
- 维生素C (VC)
- 烟酸 (VB3)
- 泛酸钙 (VB5)
- 肌醇和生物素等;
- 使用浓度一般为0.1 ~ 1 mg/L。

- 这些维生素类物质的添加对愈伤组织和器官形成有促进效果。
- 维生素C还有防止组织褐变的作用。
- 肌醇(环己六醇)也是常用的有机营养成分之一，它有助于提高维生素B1的效果，促进愈伤组织形成和不定芽、不定胚的分化。用量一般为50～100 mg / L。

- ③氨基酸类

- 常用的氨基酸有甘氨酸、酪氨酸、丝氨酸、谷氨酰胺、天门冬酰胺等。
- 氨基酸类物质为培养物提供有机氮源，同时促进外植体的生长及不定芽、不定胚的分化，用量一般在1～3mg / L。
- 水解酪蛋白和水解乳蛋白对胚状体的形成也有良好的促进效果。

水解乳蛋白(lactalbumin hydrolysate, LH)

●4. 植物生长调节物质

- 除营养物质外，在培养基中常加入一种或几种生长调节物质，调控和促进培养物的生长。
- 生长调节物质使用的种类和用量，因组织的不同而有较大差异，这取决于材料内生激素的水平。
- 植物生长调节剂在培养基中的用量虽然微小，但是其作用很大。
- 它不仅可以促进植物组织的脱分化和形成愈伤组织，还可以诱导不定芽、不定胚的形成。
- 可以说植物生长调节剂在植物组织培养中起着极其关键的作用。
- 最常用的有生长素和细胞分裂素，有时也会用到赤霉素和脱落酸。

- ①生长素

- 在自然界中，生长素影响到茎和节间的伸长生长、向性、顶端优势、叶片脱落、生根等。
- 在组织培养中，生长素用于诱导细胞分裂和根的分化。
- 1926年，发现了可以促进子叶鞘生长的物质，1930年证实了这种物质是吲哚乙酸（IAA）。

- 生长素由茎尖合成，沿植物体向下运输，有促进细胞生长和生根的作用。
- 在 IAA 被发现之后有类似作用的物质，如：
 - ❶ 萘乙酸 (NAA)
 - ❶ 2, 4-二氯苯氧乙酸 (2, 4-D)
 - ❶ 吲哚丁酸 (IBA)
 - ❶ 萘氧乙酸 (NOA)
 - ❶ 2, 4, 5-三氯苯氧乙酸 (2, 4, 5-T) 等也被广泛地利用。

- 在植物组织培养中，生长素在诱导愈伤组织形成和生根方面起着重要的作用。
- IBA 和NAA 广泛用于生根，并能与细胞分裂素互作促进茎的增殖。
- 2, 4-D在某些植物的组织培养中，还会诱导不定胚的形成。

- 生长素与细胞分裂素的配合使用，对于器官形成和植物体再生起到调控作用。
- 2, 4-D和2, 4, 5-T对愈伤组织诱导和生长有效。
- IAA高压灭菌会受到破坏，采用过滤除菌。
- 培养基中生长素用量为 $10^{-7} \sim 10^{-5} \text{mol/L}$ 。
- 高浓度生长素对芽的形成有抑制作用。

生长素一般溶于95%乙醇或0.1MNaOH，后者溶解效果更好。

- ②细胞分裂素

- ◆由根尖合成而向上运输。
- ◆主要作用是促进细胞分裂和器官分化，促进侧芽分化和生长，抑制顶端优势，延缓组织衰老等，有助于腋芽从顶端优势的抑制下解放出来。
- ◆可用于茎的增殖。

细胞分裂素是1948年由Skoog等发现

- 植物组织培养，培养基中加入细胞分裂素，可促进细胞分裂和由愈伤组织或器官上分化不定芽。

- 激动素 (KT)
- 玉米素 (ZT)
- 6-苄基腺嘌呤 (6-BA)
- 苄氨基嘌呤 (BAP)
- 噻重氮苯基脲 (TDZ)
- 2-异戊烯腺嘌呤 (2-ip) 等都常用。

- 其中，TDZ诱导不定芽的作用比较大，但它也很容易引起培养物的玻璃化。
- 细胞分裂素使用浓度范围在 $10^{-7} \sim 10^{-5} \text{mol/L}$ 之间。
- 培养基中添加细胞分裂素，促进细胞的分裂，诱导愈伤组织、不定芽和不定胚的产生。

玻璃化(vitrification)

- 高浓度的细胞分裂素会抑制根的产生。
- 在细胞分裂素中，ZT的价格较贵，在高压灭菌时容易被破坏，而 6-BA 和 KT则性能稳定，价格相对便宜。但是，ZT在某些植物中诱导不定胚的效果较好。

细胞分裂素一般溶于0.5M或1MHCl或稀NaOH中。

- ③赤霉素 (GA)

- 赤霉素有20多种，组织培养中常使用的是GA3，脱落酸 (ABA) 等有时也被用于植物组织培养中。
- 赤霉素能刺激在培养中形成的不定胚正常发育成小植株。
- 如在菠菜的组织培养时，GA3对器官形成表现了良好的促进作用。

- ABA有抑制生长、促进休眠的作用。
- 在植物种质资源超低温冷冻保存时，可以用来促使植物停止生长和抗寒力的形成从而保证冷冻保存的顺利进行。
- 赤霉素易溶于冷水，每升水最多可溶解1000mg。

GA3溶于水后不稳定，易分解，可用95%的乙醇配成母液置于冰箱保存备用。

- 5. 天然有机添加物质

- 培养基中常加入一些化学成分不明的复杂天然有机物质，促进愈伤组织、器官的生长，有时会收到良好效果。常用的如：

- ①水解鱚蛋白(CH)
- ①椰子汁(CM)
- ①酵母提取液(YE)
- ①番茄汁(TJ)
- ①麦芽浸出物(ME)
- ①玉米胚乳
- ①黄瓜汁
- ①香蕉泥

等。

- 这些天然有机物质，通常富含有机营养成分或生理活性物质(如激素等)。

- 天然有机物质成分复杂，不同品种、产地和成熟度的样品之间的差异较大，含有的有效成分的质和量变化较大，试验重复性比较差。
- 应尽量避免使用这些天然物质，有时只用一种氨基酸就能取代之。
- 例如在玉米胚乳愈伤组织培养中，只用L-天门冬酰胺即取代了酵母粉和番茄汁的作用。
- 有些天然有机物质还会因高压灭菌而变性从而失去效果，这时应该采取过滤的方法进行除菌。

● 6. pH

- 培养基pH是影响植物组织培养成功的因素之一。
- 灭菌前，培养基pH一般常被调节到5.7~5.8。
- pH应该根据所培养的植物种类来确定。
- pH过高(>6)培养基会变硬；pH过低则影响培养基凝固。低于5时琼脂便不能很好凝固。
- 在调整pH时，常用1mol/L或0.1mol/L的NaOH或HCl。

●7. 凝固剂

- 用液体培养基进行静止培养时，细胞和组织即沉于容器底部，因缺氧而死亡。
- 用凝固剂使培养基凝胶化而成固体状，将材料接种于培养基的表面进行培养。
- 常用凝固剂是琼脂，是一种由海藻得来的多糖类物质，用量一般在3～10g/L之间，使用浓度高培养基变硬，营养物质难以扩散到培养组织中去。

- 当培养基pH偏低或琼脂纯度不高时，应适当增加用量。
- 在灭菌温度高、灭菌时间过长、湿度过高或反复高温灭菌时，会影响琼脂的凝固。
- Celrite也是较好的凝固剂，用量为2.0~2.5g/L，比琼脂的透明性好，易于根的观察与拍照。
- 在固体培养基上培养的材料易于保存。
- 琼脂并非是培养基中一种必需的成分。商品琼脂中含有各种杂质，如钙、镁、微量元素等。
- 当进行营养方面研究时不能使用琼脂。

●8. 其他添加物

- 为减少外植体褐变，需向培养基加入一些防止褐化的物质，如活性炭、维生素C等。
- 在培养灭菌比较困难的植物材料时，可添加一些抗生素，来抑制杂菌。
- 凡须用酒精、NaOH、HCl等特殊溶剂溶解的物质，在确保充分溶解的前提下，要尽量用较少的溶剂，待完全溶解后再用蒸馏水稀释到所需浓度。

二、培养基的分类与选择

(一) 培养基的分类

- 目前, 培养基分类依据多样, 不同的角度, 其分类的结果不同, 具有特别重要的意义。
 - ◆含盐量及特点
 - ◆凝固剂添加情况
 - ◆原料的性质
 - ◆用途及特点
 - ◆其它

- 1. 根据含盐量分类

- 基本培养基配方很多，根据培养基无机盐和浓度，可分为四个基本类型。

- ◆ 高盐度培养基

- ◆ 硝酸钾培养基

- ◆ 中盐度培养基

- ◆ 低盐度培养基

- 1) 含盐量较高的培养基

- 代表是MS培养基，无机盐浓度高，特别是硝酸盐、钾离子和铵离子含量丰富，元素平衡较好，缓冲性能好。微量元素和有机成分齐全含量丰富，使用最广。

- ◆MS培养基 (Murashige and Skoog, 1962)

- ◆LS培养基 (Linsmaier and Skoog, 1965)

- ◆BL培养基 (Brown and Lawrence, 1968)

- ◆ER培养基 (Eriks-son, 1965) 等。

- 2) 硝酸钾含量较高的培养基

- 该类培养基有：

- ◆ B5培养基 (Gambor getal, 1968)

- ◆ N6培养基 (朱至清等, 1975)

- ◆ SH培养基 (Sckenk and Hidebrt, 1972) 等。

- 特点是培养基盐浓度较高，铵态氮含量较低但盐酸硫胺素和硝酸钾含量较高。

- 3) 中等无机盐含量的培养基

- 该类培养基有：

- ◆ Nitsch (1969) 培养基

- ◆ Miller (1963) 培养基

- ◆ H培养基 (Bourgin and Nitsch, 1967) 等。

- 培养基中大量元素含量约为MS培养基的一半，微量元素种类少，但含量较高，维生素种类较多。

- 4) 低无机盐含量的培养基

- 该类培养基有：

- ◆ 怀特培养基 (White, 1943)。

- ◆ WS培养基 (Wolter and Skoog, 1966)。

- ◆ HE培养基 (Heller, 1953) 等。

- 培养基的共同特点是无机盐含量低，约为MS培养基的1/4，有机成分也很低。

●2. 根据凝固剂多少分类

◆ 固体培养基 琼脂浓度 $> 0.7\%$

◆ 半固体培养基 琼脂浓度 $< 0.7\%$

◆ 液体培养基 不添加任何凝固剂

- 单细胞在液体培养基中悬浮培养，必须定时向培养基中鼓入无菌的空气或不断摇动促进培养基与容器内空气交换。
- 在原生质体培养中，采用浅层液体培养、或微滴培养、或微室培养则可保持静止而不必通气。
- 培养基中加入琼脂的浓度越高，培养基的硬度越大。

●2. 根据原料性质分类

- 早期培养基由植物无土栽培营养液发展而来。
- 某些愈伤组织能够在简单培养基(即只含有各种无机盐和一种能被利用的糖)上生长,但多数愈伤组织所需培养基中须补加多种性质不同数量不等的维生素、氨基酸、生长调节物质以及酵母浸出物等复杂的天然混合物。

- 据此培养基可分为三类：
- ①合成培养基
- 由化学成分已知的化合物配制而成的培养基。
- 某些化合物如蔗糖、维生素等在高压蒸汽灭菌的过程中可能会发生分解；在培养基的制备过程中，不同的化学组分也可能发生相互作用，导致培养基最终成分的变化。
- ②天然培养基
- 由化学成分未知的天然物质配制而成的培养基。
- ③半合成培养基
- 在合成培养基的基础上又添加了某些天然物质而制成的培养基。

(二) 基本培养基的选择

MS 培养基是Murashige 和Skoog进行烟草组织培养设计的。

- MS 培养基无机盐浓度较高，尤其是铵盐和 硝酸盐含量较高，能满足组织快速增长的要求，应用广泛。
- 但它不适合生长缓慢、对无机盐类浓度要求较低的植物，尤其不适合铵盐过高易发生毒害的植物。

- **B5培养基**

- 是为大豆组织培养而设计的。
- 在B5培养基中，铵盐的含量比较低，在豆科植物上用得比较多，也适用于木本植物。

- **N6培养基**

- 我国学者朱至清等为水稻的花药培养而设计，在水稻、小麦以及其他植物的花粉和花药培养中被广泛应用。
- N6培养基的特点是 KNO_3 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 含量较高，但不含元素钼。

豆科 (Leguminosae) , 小麦 (Triticum aestivum)

- **改良的White培养基**

- White1963提出的，在原设计基础上进行改良。
- 一种无机盐类浓度较低的培养基，pH为5.6。
- White 培养基在一般植物组织培养中用途也比较广泛，适合于生根培养和幼胚培养。

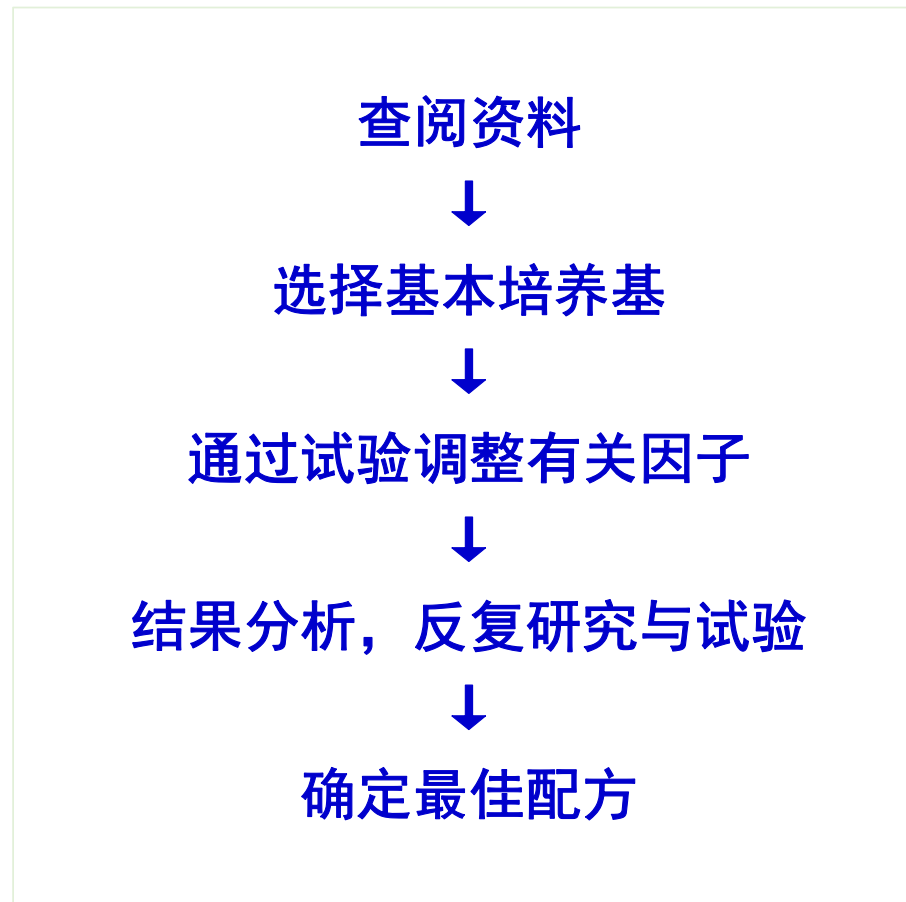
- **WPM培养基**

- 比较合适于木本植物组织培养。
- WPM培养基中氮含量比较低，有利于木本植物组织的生长和分化。

对于培养基的使用

- ●培养基是否适合所培养的植物，可以通过试验进行筛选。
- ●必要时应该对培养基的成分进行调整，以此来获得良好的培养效果。
- ●针对某一种新的植物材料，通过实验研制出一种合适的培养基，是建立一个新的组织培养体系的关键。

- 可由一种已知基本培养基通过试验加以改进，对无机成分、有机成分进行调整，生长调节物质是最敏感而常为改动的因子，特别是生长素和细胞分裂素。
- 具体地可以通过单因子试验、双因子试验、多因子试验进行筛选，采用正交设计，可一次对多个因子加以筛选，效率高。
- 培养基的组分可分为4大类：无机盐、生长素、细胞分裂素、有机物质（蔗糖、氨基酸、肌醇等），每一类物质设定高、中、低三个浓度，以此来设计试验。
- 试验程序如下。



培养基筛选的一般程序

三、培养基的配制

（一）常见培养基制备方法

➤ 干粉培养基的制备方法

➤ 间接称量法

➤ 直接称量法

• 1. 干粉培养基的制备

- 商品培养基干粉中含无机盐、维生素、氨基酸，将其溶解于蒸馏水中，然后加入蔗糖、琼脂、其他必需物质，最后用蒸馏水定容，调节 pH，高压蒸汽灭菌，冷却后，保存备用。初次加入蒸馏水的量 (ml) 要少于培养基的终体积 (ml) 减去各种成分的量之和 (g + ml)。
- 干粉培养基可用于植物快繁和生产，操作比较简单，比较粗放，节省时间，降低成本。一般人员皆可，无需特殊仪器设备。

●2. 直接称量法

- 按照培养基配方分别依次称取各种成分，依次溶解于蒸馏水中，最后用蒸馏水定容调节pH，高压蒸汽灭菌，冷却保存备用。
- 初次加入蒸馏水的量(ml)要略少于培养基的终体积(ml)减去各种成分的量之和(g+ml)的差值。

- **3. 间接法(又称母液法)**

- 在配制培养基时，如果每次都分别称量各种无机盐和维生素很麻烦，并且当用量少时会出现很大的误差，为了减少工作量，减小误差，最方便的方法是预先配制好培养基配方不同组分的母液。
- **母液**
- 根据培养基配方中的各种成分的物理与化学性质的不同，单独或分成若干组合，分别配成的浓缩储备液。



- 采用母液法制备培养基，操作简单，机动性好，特别适用于实验和研究工作。
- 采用母液法，可以准确添加任何微量的物质。
- 常见母液：

大量元素 (20X)	微量元素 (100X)	
维 生 素 (100X)	铁盐 (100X)	等。

- **母液制备注意事项：**

- ①制备母液时，一定要准确地加入各种成分并且使其彻底溶解。
- ②各种生长调节物质应分别配成母液，有的不能直接溶于水，则先用适当的溶剂溶解后再用蒸馏水定容即可。
- ③母液的浓度取决于要求的生长调节物质的使用水平。
- ④母液应在冰箱中存放，做好详细标记，包括母液名称、浓度、配制时间、配制人等必要信息，无明晰标记的母液不能用于实验。
- ⑤用前要轻轻摇动混合均匀，有的母液在低温下易析出结晶，从冰箱中取出后可在室温下静置或轻摇一会，待重新溶解后再使用。

- ⑥用时按配方给定的量及顺序依次加入，发现其中已有沉淀物或微生物污染，则应立即弃之。
- 长期存放的母液，可见絮状沉淀、颗粒状沉淀、结晶。
- 若是微生物污染，则可见或红色或灰色或白色菌落，悬浮于母液中。
- ⑦制备母液和培养基时应用蒸溜水和高纯度的化学药品。
- 制备母液的量应根据需要而定，还要考虑存放保质期。
- ⑧可以准确地加入微量物质，有效地减少操作误差。

(二) 培养基母液的配制

●1. 基本培养基母液

- 通常母液浓度是培养基浓度的 5X、10X 、20X 、100X或更高的整数倍。
- 无机盐类母液可在2~4℃冰箱中保存。
- 维生素等有机营养元素的母液，要在冷冻箱内保存，用前取出，温水中溶解后取用。

- 在配制母液时，应该把 Ca^{2+} 与 SO_4^{2-} 、 PO_4^{3-} 放在不同的母液中，以免发生沉淀。
- 配制母液的数量可以根据实际情况而定，如 MS培养基通常可以配制三液式、四液式或五液式等。
- 一般而言，有机营养成分、大量元素、微量元素可分别配成一个母液，铁盐和钙盐为单独母液。

- **2. 植物生长调节物质母液**

- 常用浓度单位有mg/L和mol/L。常用浓度1~10 mmol/L，便于计算，避免冷藏形成结晶。
- 摩尔单位直接代表每升溶液中的分子数量，这使得不同生长调节物质之间具有可比性。
- 在国际性刊物中，摩尔单位是通用单位。

- 多数生长调节物质难溶于水，配法各不同。
- ●2, 4-D、IAA、IBA、GA3 和 ZT可先用少量95%酒精溶解，再水定容，混匀后贮于试剂瓶，标记。
- ●NAA可溶于热水或少量 95%酒精中，再水定容。
- ●KT和6-BA应先溶于少量1mol/L的HCl中，再水定容。
- ●植物生长调节物质母液，一般在2~4℃冰箱中保存。
- 如预先配制好1 mmol/L的 IAA母液，若要配制IAA浓度为 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的培养基时，应取该母液的体积为0.5mL。
- ●不同的植物生长调节物质母液保存与灭菌方法各异。

- 生长调节物质母液的配制与保存

- 生长素

名称	分子量	试剂保存	母液保存	高压灭菌
IAA	175.19	冷冻	冷冻避光	○ ~ △
IBA	203.23	冷藏	冷冻避光	○ ~ △
NAA	186.21	室温可	冷藏	○
2,4-D	221.04	室温可	冷藏	○

- 细胞分裂素

KT	215.21	冷冻	冷藏	○
ZT	219.20	冷冻	冷冻避光	×
BA	225.25	室温可	冷藏	○

- 其他

GA3	346.38	室温可	冷藏	× ~ △
ABA	264.32	冷冻	冷冻避光	○ ~ △

- 备注：○可以高压高温灭菌；△有部分分解；×-需过滤除菌。

(三) 培养基配制

- 1. 培养基配制的步骤:

- ①准备工作

包括相关仪器的调试、玻璃器皿的洗涤与干燥、药品及蒸馏水的购置等。

- ②制备母液

依据培养基配方配制各种母液，保存于冰箱中待用。

●③制备培养基

- 取出母液并按顺序放好，并将有机营养物质贮液溶化待用。
- 将洁净的各种玻璃器皿如量筒、烧杯、移液管、移液枪和玻璃棒等放在指定位置。
- 取一只烧杯，放入适当量的蒸馏水，将母液按培养基配方顺序加入，并不断搅拌。
- 加入植物生长调节剂和蔗糖，待糖完全溶解后定容。
- 调整pH，用预先配好的氢氧化钠或稀盐酸进行调整。
- 将培养基倒入容器中，加入琼脂粉(7~10g/L)，并加热使其完全融解。

- ④分装

- 将培养基分装到培养器皿中，封好口。

- ⑤灭菌

- 高压蒸汽灭菌锅灭菌(121℃, 15~20min)，或过滤除菌。

- ⑥保存备用

- 灭菌完毕，待高压蒸汽灭菌锅温度下降至室温且放气阀孔无水蒸汽冒出时便可以开锅取物，冷却凝固后保存待用。

- **2. 配制培养基应注意的事项**

- ①应选用高纯度的化学药品，凡是标晰不明确、存放太久、有杂质、有沉淀、颜色有变化、混浊、被微生物污染等现象者一律都不能使用。
- 一般应选择分析纯的药品。
- ②各种成分称量准确，并按配方顺序依次准确加入，充分搅拌，待前一种物质成分完全溶解后，再加入后一种成分。直到除琼脂外的所有成分都已加入并充分搅拌至完全溶解后，用相应的量筒精确定容。

- ③选用适当大小的烧杯，加入适量的蒸馏水。初次加入蒸馏水的量（ml）要略少于培养基的终体积（ml）减去各种成分的量之和（g+ml）的差值。初次水量太少，则加入各种成分后溶液中的离子浓度太高，有可能导致离子间的相互作用。初次水量太多，则加入各种成分后溶液的体积可能超过计划的终体积。
- ④调整 pH 时，要有耐心和细心，熟练正确地使用pH计。
- 切忌反复滴加酸、碱，导致培养基体积的改变及其他不良影响。

- ⑤琼脂粉要全部加入到容器的底部，切忌粘附到容器壁上，影响溶（融）解。

倒入溶液时要用玻璃棒作导引，沿容器壁缓慢加入，切忌因操作不当，液体快速突然落下，致使琼脂粉飞溅到容器内壁上。

- ⑥加热使琼脂粉充分融化并混合均匀，然后分装于培养容器。
- 分装操作时要确保培养容器口部干净，切勿粘附培养基。
- 三角瓶等封口时，捆扎松紧要合适，已老化的、易断裂的橡皮筋等禁用。
- 用于封口的耐高温塑料纸，应该是洁净而完好无损。

- ⑦用高压蒸汽锅灭菌时，培养容器在锅内要摆放稳当，以免因加热水沸腾引致锅体振动而使培养容器倒伏。
- 在确保灭菌效果满足要求的情况下，尽量采用较低的灭菌温度和较短的灭菌时间，切不可长时间高温处理，更不可反复高温灭菌处理。
- ⑧已灭菌的培养基经标记后，分类存放于干燥清洁的柜子，一般情况下，7~10d以后，剔除污染者或其它出现异常现象者，无污染者即可用于实验。

第4节 离体培养体系的建立

- 植物组织培养是生物工程技术的重要组成部分。
- 建立高效稳定的离体培养体系是非常必要的。
- 是组织培养的基础。
- 是生产中扩繁优良品种和无毒苗有效途径之一。

一、供体植物材料

- 如何控制杂菌污染，是初代培养操作的关键。
- 植物材料来源、取材部位和时期不同，污染情况不同。
- 为获取良好实验材料，对植物进行合理栽培管理十分必要。

(一) 野外生长或田间种植的材料

组织培养常取材于野外生长或田间种植的植物材料。

- 在田间栽培植物材料时，应选择性状优良的、抗逆性强的、品色俱佳的优良品种。
- 选择良好的种植环境。



- 根据取材要求适时栽培。在管理上要精耕细作，加强水肥调控，防治病虫害，获取良好的实验材料，取得优良的外植体。
- 如果要用作遗传操作的外源DNA最终受体，则应选择具有遗传背景丰富雄厚且遗传性稳定的材料！
- 尚处在不稳定状态的新种质材料，一般来说不宜作为遗传转化的最终受体。
- 即便是为控制病虫害，也不宜使用过多的内吸性药剂。
- 对于田间病虫害较严重的材料，可在适当的时机移植到温室内，科学管理，以降低其体内带菌的基数。
- 必要的话，可实施人工脱毒。

(二) 温室种植的材料

- 在具备温室设施的条件下，可以在温室栽培材料供组织培养取材。
- 在温室栽培材料不受气候条件的限制, 还可根据实际需要随时栽植。
- 温室为植物提供良好的生长环境，植物受伤较少，病虫害易控制。
- 利用温室可以获得健康的植物材料，初代污染也可以得到有效的控制。



(三) 无菌发芽材料

- 种子繁殖的植物，可在培养室无菌发芽，然后获取组织培养所需的试材。
- 做法：准备无菌培养皿、滤纸和无菌水。将消毒的种子在培养皿中无菌培养，发芽长成小苗便可作为试材。



(四) 休眠种子处理

- 正处在休眠状态的种子，用约1500mg/L的赤霉素浸泡约30h，打破休眠。
然后再进行消毒和培养。



二、外植体的选择和处理

(一) 外植体的选择原则

- 1. 再生能力强
- 按细胞全能性，植物任何体细胞都具有再生成完整植株的潜能。
- 已分化体细胞的再生须经脱分化与再分化两个基本过程。
- 不同体细胞分化程度不同，脱分化难易程度也不同，如形成层和薄壁细胞比厚壁细胞易脱分化。
- 分化程度越高脱分化也越难。在外植体的选择上，应该尽量选择未分化或分化程度较轻的组织作为外植体使用。

- 一般情况下，年幼的组织比年老的组织好，故茎尖和嫩梢是很好的外植体材料。
- 在季节上，尽量选择在材料旺盛生长时取材。因为旺盛生长时期的材料内源激素的含量较高，再分化比较容易。
- 应选择年幼的植株, 和春天刚萌发的幼芽。

- **2. 遗传稳定性好**

- 无论是大量繁殖，还是遗传转化，保持原物种的优良性状是植物组织培养的基本要求。因此，在选择外植体时，应选取变异较少的材料。同时，在进行组织培养的过程中，也应减少组织的变异现象。

- **3. 外植体来源丰富**

- 为了建立一个高效而稳定的植物组织离体培养体系，往往需要反复实验，并要求实验结果具有可重复性。因此，就需要外植体材料丰富并容易得到。

●4. 外植体灭菌

- 在选择外植体时，应尽量选择带杂菌少的组织，减少培养中的杂菌污染。
- 一般地上组织比地下组织灭菌容易，一年生组织比多年生组织灭菌容易，幼嫩的组织比老龄和受伤的组织灭菌容易。
- 一般情况下，组织内部带菌的材料不宜用作外植体。

(二) 常用作外植体的材料

- 植物组织培养常用的外植体有：

- ◆茎尖

- ◆节间部分

- ◆叶和叶柄

- ◆鳞片

- ◆种子、根、块茎、块根、花球、花粉与花药等。

●1. 茎尖

- 茎尖是植物组织培养中，最常用的试材之一。
- 茎尖生长速度快，繁殖率高，不容易产生遗传变异，茎尖培养是获得脱毒植株的有效途径。
- 以繁殖为目的，茎尖大小可以自由选择。
- 以脱毒为目的，应取小于 0.4mm的茎尖培养脱毒效果较好。

●2. 节间部

- 大部分果树和花卉等植物，新梢的节间部是组织培养的较好材料。
- 新梢节间部不仅灭菌容易，而且脱分化和再分化能力较强，是常用的组织培养材料。

- 3. 叶和叶柄

- 叶片和叶柄取材容易，新出的叶片杂菌较少，实验操作方便，是植物组织培养中常用的材料。尤其是近年在植物的遗传转化中，以叶片为试材的报道很多。

- 4. 鳞片

- 水仙、百合、葱、蒜、风信子等鳞茎类常以鳞片为材料。

- 5. 其他

- 种子、根、块茎、块根、花球、花粉等也可以作为植物组织培养的材料。

(三) 外植体的消毒处理

- 在植物组织培养中，获得无菌外植体是组织培养成功的必要前提。
- 田间或温室的材料常带有大量的细菌和霉菌，通过化学药剂消除植物材料上的杂菌是植物组织培养的一个重要环节。
- 消毒处理只是清除材料表面带菌。

- 1. 常用的消毒药剂

- 消毒药剂的要求：

- ①灭菌效果好；
- ②性能稳定；
- ③从植物组织上清除容易；
- ④对人体等无害；
- ⑤无环境污染；
- ⑥价格便宜，容易获得，使用方便。

酒 精

- 70%~75%酒精，是最常用的表面消毒剂。
- 酒精具有较强的穿透力和灭菌作用，对植物材料杀伤作用也大。
- 植物材料可用70%酒精浸泡10~30s表面灭菌，再用其它灭菌剂灭菌。
- 酒精浸泡时间过长，植物材料生长会受到影响，甚至被酒精杀死。

次氯酸钠 [NaClO]

- 次氯酸钠是一种较好的灭菌剂释放出活性氯离子能杀死细菌。
- 常用浓度是有效离子为1%，一般浸泡5～30min，具体灭菌时间可根据预备试验来定。
- 次氯酸钠灭菌力强，不易残留，对环境无害
- 次氯酸钠溶液碱性强，对植物材料有一定破坏作用，处理时间不宜过长。

漂 白 粉

- 漂白粉有效成分是次氯酸钙 $[\text{Ca}(\text{ClO})_2]$ 。
- 使用浓度一般为5%~10%或饱和溶液。
- 漂白粉作用比较缓和，灭菌效果很好，对材料损伤小，对人危害小，对环境无害，是一种常用的灭菌剂。
- 性能不稳定，开瓶后，不易保存，效果会逐渐降低。不同批次的商品，药效不一样。

氯化汞(又称升汞)

- Hg^{2+} 可与带负电荷的蛋白质结合，使蛋白质变性，杀死菌体。
- 常用浓度 0.1%~0.2%，浸泡 2~15min。
- 氯化汞灭菌效果极佳，但易在材料上残留影响生长，灭菌后应彻底冲洗。
- 氯化汞对环境危害大，对人畜毒性极强，应尽量避免使用，用后要回收。

- **2. 植物材料消毒的一般过程**

- **①材料前处理**

- 从田间取回的材料，用自来水冲洗10min洗去泥土等污垢，剪去残伤的部分，再用自来水冲洗数次，然后剪成小段放入烧杯中灭菌。

- **②消毒剂配制**

- 开启超净工作台，用70%酒精，彻底消毒处理。
- 将次氯酸钠或氯化汞等灭菌剂从冰箱取出，在超净工作台内，配制成所需浓度。
- 烧杯等器具和无菌水均预先经蒸汽灭菌处理。

- 为了使灭菌剂湿润整个组织，需在药液中加入数滴(浓度小于0.1%)表面活性剂(吐温(tween) 20或吐温80)。
- 如果需用70%酒精对材料进行灭菌，还需准备好消毒用酒精。
- ③材料消毒
- 把经过前处理的材料放入70%酒精中，进行表面消毒。
- 取出后，立即放入次氯酸钠(或其他灭菌剂)中灭菌。
- 待数分钟后取出，无菌水冲洗3~5次。
- 然后，将材料放到无菌培养皿中待接种。

- 如果材料所带杂菌较少，酒精消毒的步骤也可以省略。
- 操作中所用的镊子、解剖刀、培养皿和培养皿中的滤纸，均需经过高压灭菌。
- 镊子等器具在使用时，还要随时用酒精灯消毒。

●3. 污染源及其表现特征

- 组织培养中污染是经常发生的。造成污染原因多，如外植体带菌、培养基及器皿灭菌不彻底、操作不规范等。
- 污染主要分为细菌和真菌两大类。细菌污染菌斑呈黏液状，接种1～3D即可发现。
- 除材料带菌或培养基灭菌不彻底会造成接种材料被细菌污染外，操作不慎也是造成细菌污染的重要原因。

- 真菌污染部分长有不同颜色的霉菌，在接种3d甚至半个月后才出现。
- 造成真菌污染的原因多为外植体本身带菌、周围环境不清洁、超净工作台过滤装置失效、培养器皿口径过大等。
- 为减少损失，提高工作效率，必须在每个操作环节上都注意防止污染的发生。

三、培养条件

- 培养条件是调控外植体生长分化的外界条件。
- 植物组织培养的环境条件如温度、光照、湿度等需严格控制。
- 培养基成分和pH等的调整，可通过培养基的更新来实现。

(一) 温 度

- 温度是影响外植体生长分化的重要条件之一。
- 大多数情况下，一个培养室内同时培养着多种植物，室内温度一般设定在 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。
- 植物在自然界中长期进化，不同植物对环境温度的要求各异。

- 生长在高寒地区的植物，其最适生长温度较低；而生长在热带地区的植物，则对环境温度相对要求较高。
 - 马铃薯在20℃情况下培养效果较好。
 - 菠萝在 28~30℃情况下培养效果较好。
- 根据不同植物对环境温度的要求来设定培养室温度。一般培养室的温度最高不高于35℃，最低不低于15℃。

(二) 光 照

- 植物组织培养光照强度范围约为1000~6000Lx，常用光照强度为3000~4000Lx。
- 大多数植物在有光的情况下生长分化较好，如：
- 在天竺葵愈伤组织诱导不定芽时，每天15~16h光照效果较好。
- 在杨树组织培养中，红光有促进愈伤组织生长的作用，而蓝光则有阻碍作用。

- 光质对植物组织分化的影响，目前尚无一定规律可循，这可能是不同植物对光信号反应不同所致。
- 光周期也是影响外植体分化的条件之一。
- 如：葡萄茎段培养，对日照敏感的品种只有在短日照条件下才可能形成根，而对日照长度不敏感的品种在任何条件下培养均可形成根。
- 钻天杨在每天 16H光照下最有利于不定芽的形成。
- 在一般情况下，培养室的光周期被设定为16H光照、8H黑暗。

(三) 湿 度

- 培养瓶内相对湿度在培养初期接近100%，之后随着培养时间的延长，水分会逐渐逸失，相对湿度也会有所下降，因此，在培养容器封口材料选择上应十分注意，所选择的封口材料至少要保证在一个月内有充足水分来满足培养材料的需要。
- 如果培养容器内水分散失过多，培养基渗透压升高，会阻碍培养物的生长和分化。
- 封口材料过于密闭，影响气体交流导致有害气体难以散去，也会影响培养物的生长和分化。
- 植物组培室相对湿度保持在70%~80%为宜。

(四) 培养基的营养物质和pH变化

随着培养物的持续生长和分化，培养基所含的营养物质（如糖、维生素和无机营养成分）以及植物生长调节剂等均会被逐渐吸收而减少，培养物的生长速度也随之逐渐降低，乃至停止生长和分化。

- 同时，培养基的PH也会有所变化。尤其当大量的金属离子被吸收时，PH会随之降低，甚至会影响培养物的生长发育。
- 为解决这一问题，最好每月更新1次培养基，也可以在培养容器容量允许的情况下增加培养基的数量，并尽量选用营养元素能被平衡吸收的培养基。

(五) 培养物的气体环境

- 氧气是植物组织呼吸活动所必需的。
- 固体培养接种时，不要把培养物全部埋入培养基中，避免氧气不足，注意瓶内与外界保持通气状态。
- 液体培养时，采用振荡等方法，确保氧气供应。
- 刚切割的外植体会产生乙烯，造成材料的老化，从而影响培养生长和分化。
- 培养物产生 CO_2 ，当浓度过高时，也会阻碍培养物的生长和分化。
- 培养时应注意瓶内的通气状况，如使用棉塞或通气好的封口膜封口。

