

## 任务 3.4 培养基配制

### 任务目标

知识目标: 1. 了解培养基的组成成分及作用。

2. 掌握常用培养基的种类及特点。

3. 理解培养基母液配制的目的和意义。

技能目标: 1. 能按照配方规范地完成各类培养基母液的配制。

2. 能正确进行培养基母液的保存。

3. 能根据配方独立进行培养基母液的量取、培养基的配制与分装。

4. 会规范使用高压蒸汽灭菌锅对培养基进行灭菌,并能正确存放。

### 任务准备

#### 一、培养基的组成

经科研人员的大量实验,形成了基础培养基配方和用于不同培养目的的个性化培养基配方,但其主要成分由水、无机盐、有机物、植物生长调节物质、培养基的其他物质五大类组成。

##### (一) 水

水是植物原生质体的组成成分,也是一切代谢过程的介质和溶媒。它是生命活动过程中不可缺少的物质。配制培养基母液时要用蒸馏水,以确保母液及培养基成分的精确性,防止储存过程发霉变质。大规模生产时可用自来水。但在少量研究上尽量用蒸馏水,以防成分的变化引起不良效果。

## (二) 无机盐

### 1. 大量元素

大量元素指使用浓度大于 0.5 mmol/L 的元素,有 N、P、K、Ca、Mg、S 等。培养基中的大量元素常由  $\text{KNO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{KCl}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  等化合物来提供。

### 2. 微量元素

微量元素指使用浓度小于 0.5 mmol/L 的元素,包括 Fe、B、Mn、Zn、Cu、Mo、Co 等。

Fe 是一些氧化酶、细胞色素氧化酶、过氧化氢酶等的组成成分。同时,它又是叶绿素形成所必需的。培养基中的铁对胚的形成、芽的分化和幼苗转绿有促进作用。在制作培养基时不用  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  和  $\text{FeCl}_3$ ,因其 pH 在 5.2 以上,易形成  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  的不溶性沉淀,而是用  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  结合成的螯合物。B、Mn、Zn、Cu、Mo、Co 等,也是植物组织培养中不可缺少的元素,缺少这些物质会导致生长发育异常。

## (三) 有机物

### 1. 糖类

这类有机物的作用一是培养物赖以生长的碳源;二是使培养基维持一定的渗透压。常用的有蔗糖、葡萄糖、果糖、麦芽糖、半乳糖、甘露糖等在组织培养中也有应用。使用浓度一般在 2% ~ 3%。在大规模生产时,可用食用绵白糖代替。

### 2. 维生素类

这类化合物在植物细胞中主要以各种辅酶的形式参与多种代谢活动,对生长、分化等有很好的促进作用。常用种类有硫胺素(维生素  $\text{B}_1$ )、吡哆醇(维生素  $\text{B}_6$ )、烟酸(维生素  $\text{B}_3$ ,又称维生素 PP)、泛酸(维生素  $\text{B}_5$ )、生物素(维生素 H)、钴胺素(维生素  $\text{B}_{12}$ )、叶酸(维生素  $\text{B}_9$ )等。使用浓度一般为 0.1 ~ 1.0 mg/L。

### 3. 肌醇(环己六醇)

肌醇的主要作用:在糖类的相互转化中起重要作用;参与细胞壁和细胞膜的构建;能促进愈伤组织的生长以及胚状体和芽的形成;对组织和细胞的繁殖、分化有促进作用。使用浓度一般为 100 mg/L。

#### 4. 氨基酸

氨基酸是很好的有机氮源,可被细胞直接吸收利用。常用种类有甘氨酸、精氨酸、谷氨酸、谷酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺、丙氨酸等。有时应用水解乳蛋白(LH)或水解酪蛋白(CH),但由于它们营养丰富,极易引起污染。如在培养中无特别需要,以不用为宜。

#### 5. 天然复合物

天然复合物的成分比较复杂,大多含氨基酸、激素、酶等一些复杂化合物。它对细胞和组织的增殖与分化有明显的促进作用,但对器官的分化作用不明显。它的成分大多不清楚,所以一般尽量不使用。

(1) 椰乳 是椰子的液体胚乳。它是使用最多、效果最大的一种天然复合物,一般使用浓度在10%~20%。它在愈伤组织和细胞培养中有促进作用。在马铃薯茎尖分生组织和草莓微茎尖培养中起明显的促进作用,但茎尖组织的大小若超过1 mm时,椰乳就不发生作用。

(2) 香蕉 用量为150~200 g/L。主要在兰花的组织培养中应用,对原球茎增殖有明显促进效果,并有利于壮苗与生根。

(3) 马铃薯 去掉皮和芽后,加水煮30 min,经过过滤,取其滤液使用。用量为150~200 g/L。添加后可得到健壮的植株。

#### (四) 植物生长调节物质

植物生长调节物质是培养基的关键物质,对植物组织培养起着决定性作用,控制着培养物的脱分化、再分化和形态建成。

##### 1. 生长素类

(1) 作用 在组织培养中,生长素主要被用于诱导愈伤组织形成,诱导根的分化和促进细胞分裂、伸长生长。

(2) 种类及活性 常用种类有IAA(吲哚乙酸)、NAA(萘乙酸)、IBA(吲哚丁酸)、2,4-D(2,4-二氯苯氧乙酸)等。作用能力的强弱顺序为:2,4-D>NAA>IBA>IAA。

(3) 稳定性 IAA是天然存在的生长素,高温高压易被破坏,也易被细胞中的IAA分解酶降解,受光也易分解,故要避免储存,过滤灭菌。其他3种生长素为人工合成,耐高温高压,不易被分解破坏。特别是NAA稳定性好,活性较高,价格低廉,所以应用最普遍。

(4) 溶解性 生长素不溶于水,IAA、NAA、IBA配制时可先用少量95%酒精助溶。2,4-D可用0.1 mol/L的NaOH或KOH助溶。

##### 2. 细胞分裂素类

(1) 作用 诱导芽的分化,促进侧芽萌发生长,细胞分裂素与生长素相互作用,当组织内细胞分裂素/生长素的比值高时,诱导愈伤组织或器官分化出不定芽,促进细胞分裂与扩大,抑制根的分化。因此,细胞分裂素多用于诱导不定芽的分化,茎、苗的增殖,而避免在生

根培养时使用。

(2) 种类及活性 这类激素是腺嘌呤的衍生物,包括 6-BA(6-苄氨基嘌呤)、KT(激动素)、ZT(玉米素)等。作用能力的强弱顺序是:ZT>6-BA>KT,常用的是人工合成的、性能稳定的、价格适中的 6-BA。

(3) 溶解性 细胞分裂素不溶于水,也不溶于酒精,一般可溶于盐酸或 NaOH 溶液中。

### 3. 赤霉素(GA)

① 作用 有 20 多种,培养基中添加的是 GA<sub>3</sub>,主要用于促进幼苗茎的伸长生长,促进不定胚发育成小植株;此外,赤霉素还用于打破休眠,促进种子、块茎、鳞茎等提前萌发。一般在器官形成后,添加赤霉素可促进器官或胚状体的生长。

② 稳定性 赤霉素不耐热,高压灭菌后将有 70% ~ 100% 失效,应当过滤灭菌。

③ 溶解性 赤霉素溶于酒精,配制时可用少量 95% 酒精助溶。

生长调节物质的使用量甚微,一般用 mg/L 表示浓度。在组织培养中生长调节物质的使用浓度,因植物的种类、部位、时期、内源激素等的不同而异,一般生长素浓度的使用为 0.05 ~ 5 mg/L,细胞分裂素 0.05 ~ 10 mg/L。

## (五) 培养基的其他成分

### 1. 琼脂

在固体培养时琼脂是最好的固化剂。琼脂是一种由海藻中提取的高分子糖类,本身并不提供任何营养。琼脂能溶解在 90 ℃ 以上热水中,成为溶胶,冷却至 40 ℃ 即凝固为固体状凝胶。琼脂的用量在 6 ~ 10 g/L 之间。一般琼脂以颜色浅、透明度好、洁净的为上品。琼脂的凝固能力除与原料、厂家的加工方式有关外,还与高压灭菌时的温度、时间、pH 等因素有关,长时间的高温会使凝固能力下降,过酸过碱加之高温会使琼脂发生水解,丧失凝固能力。时间过久,琼脂变褐,也会逐渐丧失凝固能力。

加入琼脂的固体培养基与液体培养基相比,优点在于操作简便,通气问题易于解决,便于经常观察研究等。缺点是培养物的吸收面积小;各种养分在琼脂中扩散较慢,影响养分的充分利用;培养物排出的一些代谢废物,聚集在吸收表面,对组织产生毒害作用。

### 2. 抗生物质

抗生物质有青霉素、链霉素、庆大霉素等,用量在 5 ~ 20 mg/L 之间。添加抗生物质可防止菌类污染,减少培养中材料的损失。抗生素各有其抑菌谱,要加以选择试用,也可两种抗生素混用。但应当注意抗生素对植物组织的生长也有抑制作用。

### 3. 抗氧化物

培养基中添加抗氧化物是为了抑制外植体和培养物褐变。常用的抗氧化剂有半胱氨酸、维生素 C、柠檬酸、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)等。



4. 活性炭

活性炭有很强的吸附作用,它可以吸附非极性物质和色素等大分子物质,包括琼脂中所含的杂质,培养物分泌的酚类、醌类物质及激素等。通常使用浓度为 0.1 ~ 10 g/L。

培养基中添加活性炭的作用:防止褐化;促进生根;降低呈透明或透明水渍状的玻璃苗的产生频率;活性炭在胚胎培养中也有一定作用。但是,活性炭具有副作用,比如吸附培养基中的生长调节物质,削弱琼脂的凝固能力,添加时须注意。

二、培养基的种类

培养基的种类见图 3-23。

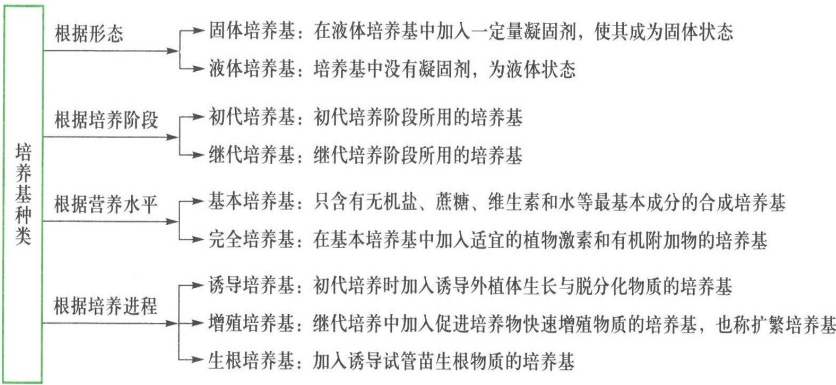


图 3-23 培养基的种类

三、常用培养基的配方和特点

目前已公开报道的培养基有许多种,各有不同的特点和适用范围,在植物组织培养生产中应根据不同的植物种类和培养部位及不同的培养目的选用不同的培养基。

常用的培养基配方见表 3-3。

表 3-3 常用培养基配方 单位:mg/L

成分	培养基名称						
	MS	B <sub>5</sub>	White	SH	Knudson C	VW	N <sub>6</sub>
KNO <sub>3</sub>	1 900	2 527.5	80	2 500		525	2 830
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1 650					500	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		134			500		463
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O			300		1 000		
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	440	150		200			166
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>						200	
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	370	246.5	720	400	250	250	185

续表

成分	培养基名称						
	MS	B <sub>5</sub>	White	SH	Knudson C	VW	N <sub>6</sub>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170				250	250	400
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O		150	17				
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>			200				
Na <sub>2</sub> -EDTA	37.3			15			37.3
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27.8			20	25		27.8
FeSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O			2.5				
KCl			65				
Fe <sub>2</sub> (C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> ) <sub>3</sub>						28	
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>				300			
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O				10			
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	22.3	10	5		7.5	7.5	4.4
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8.6	2.0	3	1.0			3.8
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	3.0	1.5	5.0			1.6
KI	0.83	0.75	0.75	1.0			0.8
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.25	0.25		0.1			
MoO <sub>3</sub>			0.001				
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	0.01	0.2			
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.025	0.025		0.1			
盐酸硫胺素(维生素 B <sub>1</sub> )	0.1	10	0.1	5.0			1
烟酸	0.5	1.0	0.3	5.0			0.5
盐酸吡哆醇(维生素 B <sub>6</sub> )	0.5	1.0	0.1	5.0			0.5
肌醇	100	100		1 000			
甘氨酸	2.0		3.0				2.0
蔗糖	30 000	20 000	20 000	30 000	20 000	20 000	50 000
pH	5.8	5.5	5.6	5.8	5.8	5.5	5.8

常用培养基的特点见 3-4。

表 3-4 常用培养基的设计由来、特点及适用范围

培养基名称	设计由来	特点	适用范围
MS	1962 年由 Murashige 和 Skoog 为培养烟草细胞而研制	无机盐和离子浓度较高,为较稳定的平衡溶液;它的硝酸盐和铵盐含量较其他培养基为高,比例也比较合适,不需要添加更多的有机物	广泛地用于植物的器官、花药、细胞和原生质体培养

续表

培养基名称	设计由来	特点	适用范围
B <sub>5</sub>	1968 年由 Gamborg 等为培养大豆根细胞而研制	除含有较高的钾盐外,还含有较低的氨态氮和较高的盐酸硫胺素	适合双子叶植物,尤其木本植物的培养
White	1943 年由 White 为培养番茄根尖而研制	无机盐浓度较低,提高了 MgSO <sub>4</sub> 的浓度	适于生根培养
SH	1972 年由 Schenk 和 Hidebrandt 研制	盐分浓度较高,铵态氮含量较低,盐酸硫胺素和硝酸钾含量较高	在不少单子叶和双子叶植物的组培中应用效果较好
Knudson C	1922 年由 Knudson 为兰科种子培养而研制,后经多次改良	成分简单,不能满足大多数植物组织细胞的生长发育所需的营养物质	适于兰科植物种子培养和萌发
VW	Vacin 和 Went 在 1949 年研制	培养基的总离子浓度稍低些,磷以磷酸钙的形式供给	适于气生兰的组培
N <sub>6</sub>	1974 年朱至清等为水稻等禾谷类作物花药培养而研制	成分较简单,KNO <sub>3</sub> 和 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 含量高	适于单子叶植物花药培养,广泛应用于小麦、水稻及其他植物的花药培养

四、培养基母液的配制

所谓母液是欲配制培养液的浓缩液,也称储备液。母液配制的目的—是方便快捷配制培养基,二是保证各物质成分的准确性。

(一) 母液配制方法

(1) 单配法 将培养基配方中的各种成分分别配成一定浓度的母液。一般以 mg/mL 表示。

(2) 混配法 将几类营养成分按配方中的用量扩大一定倍数称量,分别溶解后各类混合在一起定容到一定体积配成混合母液。

(二) 母液配制要求

(1) 母液浓缩倍数 通常大量元素浓缩 10~20 倍;微量元素浓缩 100~200 倍;铁盐浓缩 100 倍;有机物浓缩 50~100 倍(肌醇母液也可单独配制)。

(2) 防止沉淀 选用蒸馏水、分析纯或化学纯试剂。

(3) 激素母液浓度  $0.1 \sim 1.0 \text{ mg/mL}$ , 1 次配成 50 mL 或 100 mL。

### (三) 药品用量的计算

配制母液时药品用量(mg) = 配方用量(mg/L) × 浓缩倍数 × 制备体积(L)

配制激素母液时药品用量(mg) = 激素母液浓度(mg/mL) × 制备体积(mL)

### (四) 培养基母液配制流程

培养基母液配制流程见图 3-24 和图 3-25。

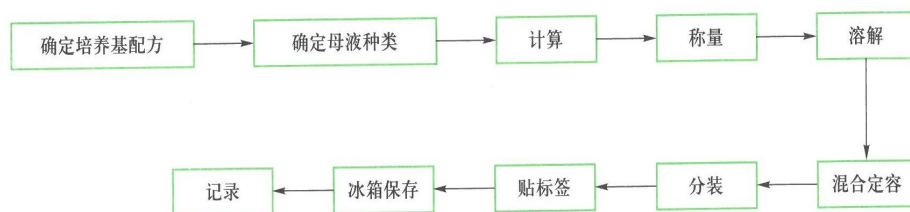
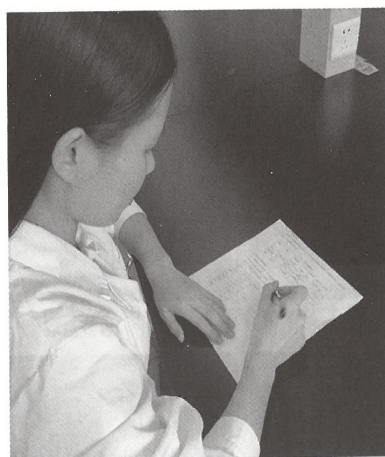


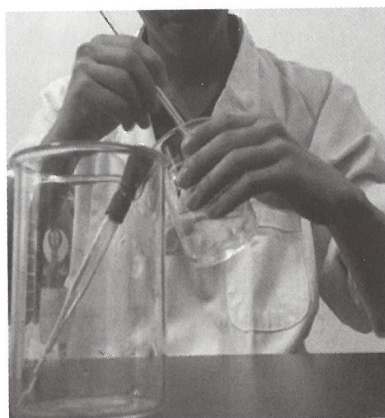
图 3-24 培养基母液配制流程图



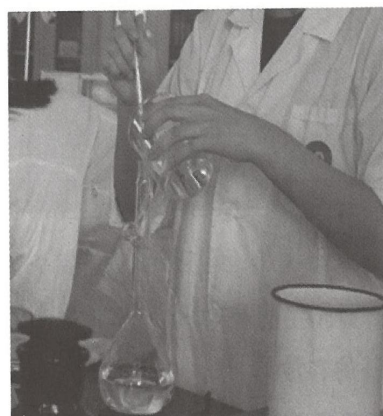
计算



称量



溶解



定容

图 3-25 母液配制主要流程实景



## 五、工作培养基的配制



### 1. 工作培养基的配制

工作培养基即组培时直接使用的培养基,平时说的培养基一般是指工作培养基,其流程图如图 3-26 所示,操作步骤如图 3-27 所示。

培养基的  
配制操作

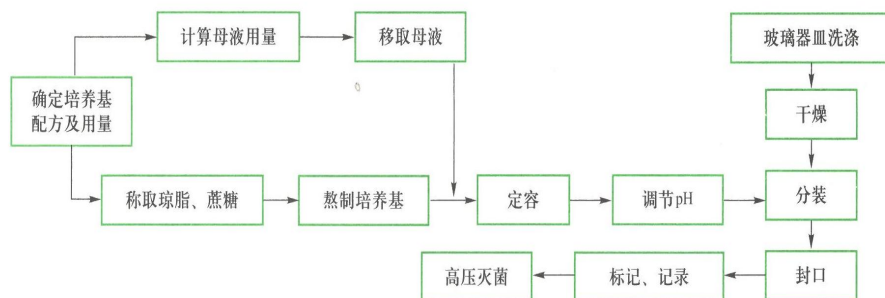


图 3-26 工作培养基配制操作流程

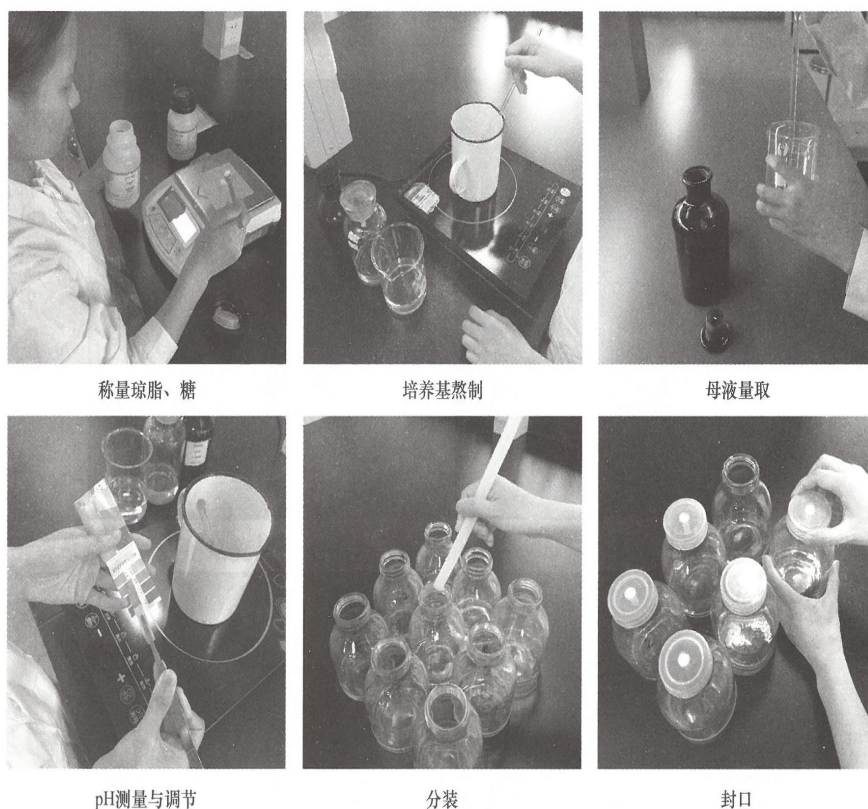


图 3-27 培养基配制的部分操作实景

### 2. 培养基的存放



培养基灭菌后送到接种室,让其自然冷却凝固,凝固过程中不要移动容器。灭好菌的培养基最好经过 3 d 的预培养,以便观察培养基是否彻底灭菌,这样能够在接种前检出,可避免因杂菌污染而造成不必要的损失。在同等条件下经多次

培养基高压  
蒸汽灭菌  
操作

使用无污染后,就没必要再摆3 d后才使用,而是冷却凝固后就可使用了。

培养基存放应注意以下几点:

(1) 防尘 依附在尘埃中的细菌、真菌等会落在培养瓶表面,使用前若不进行表面灭菌处理,在接种时就容易随着气流进入容器,使其受到污染,因此在接种的时候,用酒精棉球擦拭培养瓶表面后放到超净工作台面。

(2) 恒温 培养基冷却后,在大批量生产中可以放在装有空调的恒温接种室内,摆放2周左右。存放期间尽量避免温度有较大幅度的变化,否则容器内的空气也会随之膨胀或缩小,致使菌类进入培养基,造成储藏期间培养基的大量污染。

(3) 定期更新 结合生产任务做好培养基的配制和使用计划十分必要,一般情况下培养基储存时间不应超过1个月。

## 任务实施

### 一、MS培养基母液的配制与保存技能实训

#### 1. 目的与要求

通过MS培养基母液的配制,掌握培养基母液配制的基本技能,掌握各种母液的保存方法。

#### 2. 仪器用具与试剂

(1) 仪器设备 电子分析天平、电子天平、电炉等。

(2) 材料用具 药匙、玻璃棒、称量纸、量筒、移液管、胶头滴管、烧杯、标签纸、容量瓶、试剂瓶、洗瓶、洗耳球等。

(3) 试剂 MS培养基各成分试剂、95%酒精、1 mol/L NaOH、1 mol/L HCl、植物生长调节剂(如2,4-D、6-BA、NAA)等。

#### 3. 方法与步骤

(1) MS培养基母液配制 MS培养基母液各成分比例如表4-5所示。

① 大量元素母液 配成浓缩10倍的母液。用感量0.01 g的电子天平按表3-5称取药品,分别加入100 mL左右蒸馏水中,再用磁力搅拌器搅拌促进溶解,然后倒入1 000 mL容量瓶中,再加水定容至刻度,配成10倍母液。注意 $\text{Ca}^{2+}$ 和 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{PO}_4^{3-}$ 易发生沉淀,因此 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 充分溶解后最后加入。

② 微量元素母液 配成浓缩100倍的母液。用感量0.000 1 g的分析天平按表3-5准确称取药品后,分别溶解,混合后加水定容至1 000 mL。

③ 铁盐母液 配成浓缩100倍的母液,用感量0.01 g的电子天平按表3-5称取药品,

分别溶解,混合后加水定容至 1 000 mL。

④ 有机物母液 配成浓缩 100 倍的母液。用感量 0.001 g 的分析天平按表 3-5 分别称取药品,溶解,混合后加水定容至 1 000 mL。

⑤ 激素母液 每种激素必须单独配成母液,浓度一般为 0.1 ~ 1.0 mg/mL,用时根据需要取用。多数激素难溶于水,要先溶于特定溶剂,然后才能加水定容。具体方法为:IAA、IBA、GA、NAA 等先溶于少量 95% 的酒精中,再加水定容到一定体积;2,4-D 可用少量 0.1 mol/L 的 NaOH 溶解后,再加水定容到一定体积;KT 和 6-BA 先溶于少量 0.1 mol/L 的 HCl 中再加水定容。

表 3-5 MS 培养基母液的各成分比例

母液种类	成分	规定量 /(mg/L)	扩大倍数	称取量 /mg	母液体积 /mL	配 1 L 培养基 吸取量/mL
大量 元 素	KNO <sub>3</sub>	1 900	10	19 000	1 000	100
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1 650		16 500		
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	370		3 700		
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170		1 700		
	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	440		4 400		
微量 元 素	MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	22.3	100	2 230	1 000	10
	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8.6		860		
	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		
铁 盐	Na <sub>2</sub> -EDTA	37.3	100	3 730	1 000	10
	FeSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	27.8		2 780		
有 机 物	甘氨酸	2.0	100	200	1 000	10
	盐酸硫胺素	0.1		10		
	盐酸吡哆醇	0.5		50		
	烟酸	0.5		50		
	肌醇	100		10 000		

(2) MS 培养基母液保存 将配制好的母液分别倒入试剂瓶中,贴好标签,在标签上注明母液名称、配制倍数(或浓度)、配制人、配制日期,然后放入冰箱内 4 ℃ 低温保存,用时再按比例稀释。

#### 4. 培养基母液配制时应注意的问题

在培养基母液配制过程中,如果  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  没有完全溶解,会导致大量元素母液产生浑浊或沉淀,另外要特别注意各类母液标签的书写,尤其是激素母液,其浓度单位为  $\text{mg/mL}$ 。

#### 5. 评价与考核

学生分小组合作完成培养基母液的配制,依据母液配制的标准进行全过程评价,MS 培养基母液的配制与保存技能实训评价与考核标准参照表 3-6 执行。

表 3-6 培养基母液的配制与保存技能实训评价与考核表

考核内容		考核标准	分值	小组互评	教师评价
准备工作		物品准备齐全、合理,摆放整齐	5		
母液配制	计算	根据培养基配方、母液扩大倍数(浓度)、母液体积计算各种药品的用量	20		
		计算正确,结果准确无误			
		所用药品与配方药品一致			
	药品称量	用适宜精度的天平称量所需药品	15		
		天平操作规范熟练,称量准确			
	药品溶解	选择适宜量程的烧杯溶解药品	15		
		采用正确的溶解方式,玻璃棒使用正确			
		溶剂选用合理,溶解彻底,溶液不浑浊或沉淀			
	定容	根据配制的量选择合适的容量瓶准确定容	15		
		定容方法正确,平视溶液凹面和刻度线一致			
	装瓶	用配好的母液润洗试剂瓶	5		
		将混合均匀的母液转移至试剂瓶中			
		装瓶引流,不洒不漏			
标记	标签信息包含母液名称、配制倍数(浓度)、配制人、配制日期等	10			
	标签贴到母液瓶中间位置				
	标记清楚了				
母液的保存		放入冰箱 0~4℃进行冷藏	5		
		母液瓶放置合理,标签朝外对着冰箱门			



续表

考核内容	考核标准	分值	小组互评	教师评价
团队协作	操作文明,小组成员分工明确,相互协作、积极思考、认真讨论	5		
现场整理	器皿和用具摆放有序,场地整洁,物品按要求整理归位	5		
总分		100		

## 二、MS 固体培养基的配制与灭菌技能实训

### 1. 目的与要求

通过 MS 固体培养基的配制,学习培养基配制与灭菌的方法。

### 2. 仪器用具与试剂

(1) 仪器用具 药匙、玻璃棒、称量纸、胶头滴管、洗瓶、标签纸、烧杯、量筒、移液管或移液枪、洗耳球、组培瓶、pH 试纸或 pH 计、电子天平、电磁炉、高压灭菌锅等。

(2) 试剂 1 mol/L NaOH、1 mol/L HCl、MS 培养基各种母液、各类激素母液(2,4-D、6-BA、IAA、NAA)、琼脂、蔗糖、蒸馏水等。

### 3. 方法与步骤

#### (1) 培养基的配制与分装

① 确定培养基配方及用量 根据培养对象、培养目的等,通过查阅资料及咨询等确定培养基配方(如 MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L+3% 蔗糖+0.7% 琼脂,pH 5.8),然后据接种数量和试验处理的多少确定培养基的用量(例如配制 1 L 培养基)。

#### ② 计算各种母液用量

母液取用量(mL)= 配制培养基的体积(mL)÷浓缩倍数

生长调节物质母液取用量(mL)= 培养基配方中的浓度(mg/L)×配制培养基体积(L)  
÷母液浓度(mg/mL)

1 L MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L+3% 蔗糖+0.7% 琼脂,pH 5.8,通过计算得出:大量元素(10 倍)取 100 mL,微量元素(100 倍)取 10 mL,有机物(50 倍)取 20 mL,铁盐(100 倍)取 10 mL,6-BA(0.5 mg/mL) 取 3 mL,NAA(0.1 mg/mL) 取 2 mL,蔗糖 30 g,琼脂 7 g。

③ 称取琼脂、蔗糖 用电子天平分别称取蔗糖 30 g,琼脂 7 g。

④ 量取母液 根据计算出的母液用量,按大量元素、微量元素、铁盐、有机物、植物激素的顺序依次将母液取出,混合。

⑤ 培养基熬制 量取 600 mL 蒸馏水放入加热容器中(注意蒸馏水的体积应少于所配

制培养基体积,占终体积的  $2/3 \sim 3/4$ ),加入称量好的琼脂和蔗糖,接通电源加热。边加热边搅拌,防止糊底和溢出,至完全溶化。

⑥ 定容 将母液混合液加入到琼脂完全溶化的培养基中,搅拌混匀,并加水定容到所需体积。

⑦ 调节 pH 用 pH 计或精密 pH 试纸测试培养基溶液的 pH(5.8),如果偏碱则滴加 0.1 mol/L 的 HCl 调整,偏酸则滴加 0.1 mol/L 的 NaOH 调整,直到达到配方要求值。

⑧ 分装 用乳胶管把配制好的培养基趁热分装到培养瓶中,100 ~ 150 mL 的培养瓶每瓶装入 30 ~ 35 mL 的培养基,分装时数量要均匀、合适,培养基不黏附瓶口和瓶壁。

⑨ 封口 用合适的封口材料或线绳包扎。

⑩ 标识与记录 封装好的培养基做好标记放到高压灭菌锅中准备灭菌。

## (2) 培养基的灭菌

① 使用前应仔细阅读高压蒸汽灭菌锅说明书,严格按照要求操作。

② 先在高压蒸汽灭菌锅内加纯水,加水量应按照说明书的要求,没过加热管。

③ 不可装得太满,否则因压力与温度不对应,造成灭菌不彻底。

④ 通常灭菌要求  $1.1 \text{ kgf/cm}^2$ ,锅内达  $121^\circ\text{C}$ ,按不同灭菌要求维持压力 15 ~ 40 min。

⑤ 不能随意延长灭菌时间和增加压力。培养基要求比较严格,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,琼脂在长时间灭菌后凝固力也会下降,以致不凝固。

⑥ 灭菌结束后,务必缓慢放出蒸汽,才不使压力降低太快,以免引起激烈的减压沸腾,容器中的液体四溢,培养基沾污棉塞、瓶口等造成污染。当压力逐渐降至零后,才能打开盖子。

⑦ 含吡啶乙酸或赤霉素的培养基,要在配制后的 1 周内使用完,其他培养基存放也不应超过 1 个月。最好在灭菌后 2 周内用完。

## 4. 培养基配制、分装和灭菌时应注意的问题

(1) 培养基熬制时边煮边搅拌,防止糊底。用旺火煮开,再用文火加热,直至琼脂全部溶化。

(2) 配制培养基一定按母液顺序依次加入。

(3) 熬制培养基过程中,先放入难溶解的琼脂及天然有机物(马铃薯、香蕉等),最后加入药剂混合液,因混合液中的有机物遇热时间长易分解失效。

(4) 多数植物适宜的 pH 在 5.6 ~ 6.5,而培养基经高压灭菌 pH 一般会降低 0.2 ~ 0.3 个单位,故调节 pH 时应比选定 pH 提高 0.2 ~ 0.3 个单位。

(5) 分装培养基时,注意不能将培养基溶液喷洒到瓶口处,否则容易落菌污染。

(6) 灭菌过程中须完全排除锅内冷水汽,使锅内全部是热水蒸汽,灭菌才能彻底。

(7) 培养基灭菌严格按照要求时间进行,如超过时间,培养基成分发生变化易失效。

(8) 培养基灭菌后,立即取出摆平冷却。取出过晚凝固差,影响接种转苗质量。

## 5. 评价与考核

学生分小组合作完成培养基的配制,并汇报任务完成情况,观察在配制培养基过程中的现象与遇到的问题,并加以解释。教师对学生进行全过程评价,评价与考核标准参照表3-7 执行。

表 3-7 培养基的配制与灭菌技能实训评价与考核表

考核内容		考核标准	分值	小组互评	教师评价
准备工作		检查各种母液有无沉淀和浑浊	5		
		物品准备齐全、合理,摆放整齐			
培养基的配制	计算	根据培养基配方、体积、母液浓度,正确计算各类母液、蔗糖、琼脂的用量	15		
		计算方法正确,结果准确无误			
	药品称量和移取	准确称量琼脂和蔗糖	10		
		正确移取各类母液			
		天平操作规范熟练,称量准确			
		移液管使用正确			
	加水	在加热容器中加入总容积 2/3 左右的蒸馏水,不可过多或过少	5		
	熬制	培养基熬制过程中搅拌、加热方法正确,不糊锅,不外溢	10		
		琼脂溶解充分			
	定容	转移溶液时操作熟练,无溶液溅出容器外	5		
		定容方法正确,体积准确			
	调 pH	用 pH 计或精密 pH 试纸测量培养基的 pH	10		
		用 0.1 mol/L 的盐酸或氢氧化钠调至所需数值			
		pH 计或精密 pH 试纸使用正确,调节准确			
	分装	趁热分装到摆放好的培养瓶中	5		
		分装时不接触培养瓶,培养基不溅到瓶口或瓶壁			
		分装均匀,体积变化小			
		培养瓶表面和台面洁净			
	封口	选用合适的封口材料	5		
		培养瓶倾斜度不超过 45°,松紧适宜,瓶盖旋紧			
	标签	培养基配方和日期等标记清楚、正确	5		

续表

考核内容	考核标准	分值	小组互评	教师评价
高压灭菌	高压蒸汽灭菌锅使用规范	15		
	正确设置灭菌温度和灭菌时间			
	操作熟练			
	灭菌后取出培养基冷却,培养基放置平稳,存放环境符合要求			
团队协作	小组成员分工明确,相互协作、积极思考、认真讨论	5		
现场整理	操作文明安全,器皿和用具摆放有序,场地整洁,物品按要求整理归位	5		
总分		100		

### 任务反思

1. 给出扩大倍数和体积,让学生分别写出培养基母液配制方法步骤。
2. 配制培养基母液时应注意哪些事项?
3. 如何根据培养基配方和体积进行培养基的配制?
4. 培养基为什么要调 pH?
5. 高压灭菌时应注意哪些事项?