**实验一 培养基的配制**

**一、实验目的**

掌握MS培养基母液及MS培养基的配制与灭菌方法，并为后续实验配制培养基。

**二、实验内容**

1. 实验室设置与基本设备简介

2. MS培养基母液的配制

3. MS基本培养基及愈伤组织诱导培养基的配制与灭菌

**三、实验分组**

分4组：

1、MS培养基母液的配制：每组各配一种母液。

2、MS基本培养基的配制与灭菌：1+2组、3+4组各配500ml。

**四、实验用品**

1、仪器与器皿：天平、高压灭菌锅、电炉；药匙、称量纸、烧杯、量筒、玻棒、试剂瓶（500、1000 ml）、pH计与pH试纸（4~8）、三角瓶（100 ml,70个）、封口膜、记号笔等。

2、试剂与药品：见表1。

**3、激素母液： 6-BA 0.5 mg/mL, IAA 0.5mg/mL。）**

4、0.5mol/L的NaOH 和HCl。

**五、实验方法**

**1. MS培养基母液的配制（称量见表1）**

* 1. **大量元素母液（10倍液）**

浓度大于0.5mM或100mg/L。

分别称取10倍用量的各种大量无机盐，溶解于大约600ml略加热的蒸馏水中（注意：前3种成分可在一起溶解，KH2PO4 和CaCl2·2H20须单独溶解后再混合），冷却后定容至1000ml，装入试剂瓶中。

**1.2 微量元素母液（100倍液）**

浓度低于0.5 mM 或 100 mg/L, 一般10-7~10-5M。

分别称取100倍用量的微量无机盐，溶解于500~800ml蒸馏水中，定容至1000 ml，装入试剂瓶中。

**1.3 铁盐母液（100倍液）**

分别称取50倍用量的Na2-EDTA·2H2O（乙二胺四乙酸二钠）和FeSO4·7H2O，各自加热（约50℃）溶解于约200ml蒸馏水中，混合、冷却、定容至500ml（75~80℃螯合1h），装入棕色试剂瓶中，用力振荡1~2min, 以防沉淀。

**1.4 有机物质母液（100倍液）**

分别称取50倍用量的各种有机物质，溶解于400ml蒸馏水中，定容到500ml，装入棕色试剂瓶中。

注意：所有母液均需标明名称、浓缩倍数和配制日期，储存在4℃冰箱，一般可存放3周左右。如果沉淀或长菌，原则上丢弃。

**2. MS基本培养基的配制与灭菌**（用于实验2无菌苗的培养，1+2组、3+4组各配500ml）

1） 取1000ml烧杯一只，加入蒸馏水400ml，然后加入大量元素10倍母液50ml，微量元素、铁盐、有机物质100倍母液各5ml，蔗糖15g，用磁力搅拌器使其完全溶解。

2）用0.5mol/L的NaOH或HCl(通常MS培养基pH在4.2左右，用NaOH调)调pH为5.8，加蒸馏水定容至500ml。

3）加入琼脂粉3.5g，在电炉上加热溶解。

4） 将溶解好的培养基分装到100ml三角瓶中，每瓶装30~35ml，用封口膜封口，进行高压高温蒸气灭菌。

5）灭菌方法：将分装好培养基的三角瓶放入金属框中，装入已加入适量蒸馏水的灭菌锅内；盖好锅盖，打开放汽阀，关闭安全阀，接通电源；待水烧开排净冷空气后，关闭放汽阀，使温度升至121℃（1.06kg/cm2或0.105Mpa)并持续15~20min；切断电源，待压力表指针回零时，打开放汽阀排出剩余蒸汽，开锅取物。

**注意：**

锅内加水不足易造成干烧而损坏灭菌锅；锅内残存冷空气会使升温减慢甚至达不到预期温度；灭菌温度过高会使糖类焦化，可能有毒；灭菌时间过长会使有机物分解、盐沉淀、培养基难凝固；过早开阀会使培养基外溢。

6）在三角瓶壁上标好培养基名称、小组名和日期，存放于阴凉洁净处。

**3、愈伤组织诱导培养基的配制与灭菌（用于实验3愈伤组织诱导）**

1） 取1000ml烧杯一只，加入蒸馏水400ml，然后加入大量元素10倍母液50ml，微量元素、铁盐、有机物质100倍母液各5ml，蔗糖15g，用磁力搅拌器使其完全溶解。

2） 第3组：IAA：0.4mg/L，6-BA：1mg/L（终浓度）；

加IAA母液1.3ml (终浓度1.3mg/L)，加6-BA母液0.5mL (终浓度0.5mg/L)，第4组：加IAA母液0.7mL（终浓度0.7mg/L)，加6-BA母液0.5mL (终浓度0.5mg/L)。

3） 用0.5mol/L的NaOH或HCl (通常MS培养基pH在4.2左右，用NaOH调)调pH为5.8，加蒸馏水定容至500ml。

4）加入琼脂粉3.5g，在电炉上加热溶解。

5）将溶解好的培养基分装到100ml三角瓶中，每瓶装30~35ml，用封口膜封口，进行高压高温蒸气灭菌。

6）灭菌方法：将分装好培养基的三角瓶放入金属框中，装入已加入适量蒸馏水的灭菌锅内；盖好锅盖，打开放汽阀，关闭安全阀，接通电源；待水烧开排净冷空气后，关闭放汽阀，使温度升至121℃（1.06kg/cm2或0.105Mpa)并持续15~20min；切断电源，待压力表指针回零时，打开放汽阀排出剩余蒸汽，开锅取物。

**注意：**

锅内加水不足易造成干烧而损坏灭菌锅；锅内残存冷空气会使升温减慢甚至达不到预期温度；灭菌温度过高会使糖类焦化，可能有毒；灭菌时间过长会使有机物分解、盐沉淀、培养基难凝固；过早开阀会使培养基外溢。

7）在三角瓶壁上标好培养基名称、小组名和日期，存放于阴凉黑暗处*（*IAA见光分解）。

**六、实验报告：每人一份。**

1. 实验目的

2. 实验方法：按你所在小组所做的内容写，可用流程图表示。

2.1 MS培养基母液的配制：种类与数量。

2.2 MS基本培养基的配制与灭菌。

2.3 愈伤组织诱导培养基的配制与灭菌。

3. 实验现象与问题。

表1 MS培养基母液配制表

