

植物组培抗菌剂 (Plant Preservative Mixture (PPM))

货号: P5550

规格: 25ml/100ml

保存: 4°C 保存, 至少保存 1 年。

产品说明:

植物组织培养可以依阶段区分为: 一、引发愈伤组织(callus), 因为只有 callus 可以进行组织培养。二、从 callus 诱导成根或芽。组培的方式可以分为 3 种: 1) 固体培养, 将植物组织放置于固体培养基上, 通常培养在玻璃瓶或塑胶瓶内。2) 平板培养, 将植物组织埋于固体培养基中, 并且培养在培养皿。3) 液体培养, 将植物组织培养在液体培养基中, 一般来说培养在生物反应器内, 可以再细分为静止培养、悬浮培养和漂浮培养。在整个组织培养的过程, 最担心的就是微生物的污染, 所以用于植物组织培养的抗菌与抗真菌剂是非常必须的。

植物组培抗菌剂(Plant Preservative Mixture, PPM)是一种广谱抗微生物剂, 可以杀死细菌和真菌细胞, 防止真菌孢子的萌发, 并在较高浓度下能消除内源性污染的外植体。研究表明 PPM 活性成分可以穿透真菌或细菌细胞壁, 抑制柠檬酸循环和电子传递链等中心代谢循环中的关键酶的活性, 并且可以抑制培养基中的单糖和氨基酸向真菌和细菌细胞的运输。PPM 能有效地抑制植物细胞和植物组织培养中的通过空气、水、人传播的微生物污染及内源性污染, 而不会影响体外种子发芽、愈伤组织增殖和愈伤组织的再生。与普通的抗生素相比, 优势体现在: 1) 是一种广谱、高效抗菌/抗真菌剂。2) 比常用抗生素价格更低廉, 可以作为植物组织培养基的标准成分, 并可作为常规使用。3) 因为它的靶标是抑制多种酶, 所以产生抗耐药性的突变体是不可能的。4) 具有热稳定性, 可以和培养基一起灭菌。

使用方法 (仅供参考):

以下所述的操作流程是通用的, 可能需要根据待处理的特定物种稍作改动。

- 1、含有 PPM 的培养基可以在超净台外面分装, 即无需无菌操作, 等琼脂凝固后把盖子盖好。如果用泵来分装培养基, 建议在分装前后先用高压灭菌处理的热水清理导管/软管。
- 2、如果储存在无菌容器或在此之前储备液未受污染, 含 PPM 的热敏感或热稳定的液体培养基无需经微孔滤膜或高压灭菌处理。但是对于含有 200 mg/L 或更多氨基酸或蛋白质的富集培养基, 建议加入 PPM 后用滤膜过滤处理。
- 3、超净工作台里的器具(镊子或解剖刀)无需在火焰上烧, 只要定期地在 70%酒精里蘸一下即可。超净工作台无需验证, 可以在超净工作台外面的干净台面上操作, 不超过一小时即可。
- 4、PPM 溶液呈酸性, pH 3.8, 需保存在 4°C。低接种密度下推荐工作剂量 0.05-0.2% (v/v), 可在灭菌前或灭菌后加入培养基, 防止通过空气传播污染或内源性污染。处理内源性污染或获得无农杆菌的植物材料需要高剂量的 PPM。
- 5、对于一些常规情况下表皮上被大量细菌或真菌孢子污染的种子来说, PPM 的抗菌效率可能比较弱。对于体外萌发实验,

种子应该按照传统的方法先用漂白剂进行表面消毒。因此, 在含有 PPM 的萌发培养基里, 在一个非灭菌的容器中种子可以在自来水下冲洗然后在超净台中吹干。如果所使用的器具末端接触到

活性细菌、真菌组织或其它怀疑被污染的东西，这些器具应该通过高压或电子加热设备进行灭菌。

6、一般剂量水平：

除了内源性污染以外，推荐剂量是 0.05-0.2%。对于愈伤增殖、器官形成和胚胎形成，推荐的剂量范围是 0.05-0.075%。低接种密度或者处理缓慢生长的细菌条件下，在培养基灭菌前或灭菌后加入此剂量的 PPM，可防止空气传播的污染和内源性污染。要消除更高密度的内源性污染，需要增加 PPM 的剂量（参考 7-内源性污染）。

7、内源性污染

a) 对于外植体：以 1cm（或更短）外植体为例，添加 4~5% PPM 到完全 MS 基础盐中，但千万不要添加 Tween 20 和 pH 调整剂，搅拌 4~12 小时之后直接拿出。不用清洗，直接插入含有 PPM 的培养基里，若是草本植物换至 0.05~0.1%PPM 的萌发培养基即可；而木本植物则换至 0.2% PPM 的萌发培养基。

注意：以下从第 7 段（b）到 10 用于观赏植物。

b) 对于块茎，球茎和鳞状物：把整个块茎/球茎/鳞状物在漂白剂里摇或搅拌。然后用水冲洗（可以在非无菌条件下操作）。把块茎/球茎切成小片，在含有 4-5%PPM 的全基盐中摇或搅拌 12-24 h，不要加 pH 调整剂和 Tween 20。不用冲洗直接插入到含有 0.1-0.2% PPM 的培养基中。

8、如果按照以上操作流程没有取得满意的结果（尤其是厚的和非常密集的外植体、种子），我们建议按照以下流程：

a) 在水中摇或搅拌外植体（较软的组织 1h，较坚硬的组织 2 h）；

b) 在含有 50% PPM 的完全 MS 基础盐中（不加 pH 调整剂和 Tween 20）摇或搅拌 5-10 min。

c) 无需冲洗，直接把外植体插入到培养基中。如果真菌污染，可以选择额外再加入 PPM 到培养基中。然而，对于细菌或混合污染，第一个月在培养基中加入 0.05-0.2%的 PPM 是必要的。不要丢弃高度氧化的外植体，因为大约 50%的外植体在 4-6 周内即可恢复正常。

9、为了消除“组培中”污染的植物材料（抢救措施）：

注意：仅适合明显观察到受污染不超过一周的组织。

a) 在自来水细水流下面用牙刷清洗材料。在含有 50% PPM（用灭菌水稀释）中摇或搅拌 5-15 min。对于细菌或混合污染，我们建议用低 pH 值 2.8-3.2 的溶液，即 100% PPM 与 0.6g/L 的柠檬酸溶液（用灭菌水）按 1: 1 混合。

b) 不用冲洗直接把处理好的材料插入到含有 0.05-0.2% PPM 的培养基里，培养至少一个月。前 10 天弱光培养，如上所提，不要丢弃高度氧化的外植体，等 4-6 周以后将约有 50%的材料恢复。

对于真菌孢子或细菌位于外植体极深的部位，而 PPM 无法接触到的情况，需要把材料在水中浸泡一段时间，然后沿着外植体切片，在 50% PPM 中摇或搅拌 5-15 min。通过以上消毒步骤，保证 PPM 能够充分接触到外植体的整个表面。

10、去除农杆菌：

共培养之后，用水冲洗叶盘。然后把转染的叶盘在含有 100% PPM 的完全基础盐中蘸（整个叶盘）约 2 min。用两张无菌纸巾吸干放到含有常用抗生素的培养基上。三周后，转到只含有 0.05-0.075% PPM 的培养基上。

注意事项

1) 采用 PPM 消毒后首次转移的材料，我们建议把外植体完全地插入半固体培养基中。

2) 50% PPM 溶液能重复利用大约 5-10 次。重复利用的次数取决于所处理外植体的体积和接种密度。保存 50% PPM 在 4℃ 以延长它的活性。如有必要，准备两种 PPM 消毒液：一种是灭菌内源性污染，第二种是灭菌“组培中”的污染。用第二种消毒溶液处理材料后都要用 0.2 μm 的滤膜滤灭，滤灭过程可以非无菌条件下完成。一个滤器能用于溶液滤灭的整个过程。

3) 如果用 50% PPM 处理材料效果仍不佳，可以用 100% PPM。处理方法跟 50% PPM 相似，但处理时间不要超过 10 min。

4) PPM 的使用为任何一个组织培养实验室带来便利，并极大地提高技术人员和实验室的工作效率。但每个实验室的工作条件不同可能使得 PPM 效力的发挥具有一定的波动性。建议工作人员根据以上步骤操作的前提下，并进行优化调整以确认 PPM 效力发挥的最佳工作条件，或者确认 PPM 是否能满足其特定的应用要求。整体来说，PPM 是能够非常有效的预防植物样本受到的空气污染，水介质污染以及人源接触带来的各种污染。使用得当，PPM 可以拯救内源性污染的外植体；推荐剂量（0.05-0.2% (v/v)）下 PPM 几乎不造成任何负面损伤。

5) 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

