

微萍与微流培养体系

使用&操作手册

2020.01

目 录

1. 实验室日常工作
 - 1.1 微萍继代
 - 1.2 实验计数
 - 1.3 培养基配制
 - 1.4 激素配制
 - 1.5 无菌操作
 - 1.6 实验记录
2. 微流培养体系使用
 - 2.1 微流培养体系仪器介绍及参数修改
 - 2.1.1 培养体系
 - 2.1.2 微流泵
 - 2.1.3 培养箱
 - 2.1.4 微流平台及培养皿
 - 2.1.5 拍摄软件
 - 2.2 使用流程
3. 注意事项

1. 实验室日常工作

1.1 微萍继代（无菌操作）：从未添加任何激素的微萍中取出 **4-5** 个健康生长的微萍（使用无菌 **1000** 微升枪头吸取，操作不熟练时可用灼烧过的剪刀剪下较小的尖部吸取），放入新瓶中（瓶中添加适量 MS 培养基）每**两周**继代一次。

插枪头：如图



1.2 实验计数：用于实验的微萍统计分枝速率，绘制表格每天计数，记在记录本上，种下的那一天是第 **0** 天，计数 **14** 天+（根据实验需要）一般新分支长到与原分支相近大小或与之完全脱离时记为 **2** 个。

注意：

计数时须将培养皿水平拿出，防止微萍黏在培养皿盖上影响生长
培养箱内反光较为严重，如发现疑似裂口、开花个体需在体式镜下进一步观察确认。

实验设计中需设置对照。

1.3 培养基配制（以配制 1000ml 为例）

准备——称量——溶解——调 pH——定容

- 准备：1000ml 量筒.800ml 大烧杯.环形玻璃搅拌棒.MS 药品.蔗糖药品.称量纸.



- 称量：2.37gMS 粉末.10g 蔗糖.一齐倒入大烧杯中

• 溶解

要控制好加水的量！先溶解、调 PH，最后定容！

加水在 800ml 刻度线处打住（不必再多加，后期定容时可再加），加少了难溶解，加多了万一超过 1000ml 就很完蛋（要节约试剂）
搅拌至杯底蔗糖完全溶解

• 调 pH

pH 计探头常年浸泡在 3m/L 的 KCL 溶液里，使用时：

1 不要磕碰到探头（很贵）

2 让探头时刻保持湿润，且不能离开 KCL 太久，会降低灵敏度



1 用水冲洗净探头上的 KCL，冲洗液用废弃培养皿接着就好



2 将探头浸泡在水中（注意不要磕碰到探头里的那个最值钱的小玻璃珠）（注意浸没的分寸），示数稳定后以此作为基准

3 将探头浸泡在配制好的溶液中，示数稳定后，如过酸添加适量 NaOH，过碱添加适量 HCL（一定要用 **100 微升的枪** 少量多次添加，**边添加边搅拌**，）直到示数与基准值相近

4 重复步骤 1，将残液冲洗干净，将探头浸泡在原来的 KCL 溶液中，断电源

• 定容

将调好 pH 的溶液倒入量筒中，加水至 1000ml，分装至两个大三角瓶（用最大的三角瓶 液体量不宜超过三角瓶容积的 1/2 否则灭菌时会溢出）里，封口后**写好日期、试剂名称、实验人**，送往灭菌。

1.4 激素配制

常用激素有 EDTA（分子量 292.24 溶在水里）

SA（分子量 139.12 溶在酒精里）

GA₃（分子量 346.37 溶在酒精里）

以 EDTA 为例，一般取 0.29g EDTA 溶在 10ml 无菌水里，即成为 10⁻¹ 溶液，作为母液，再依次稀释（如取 10 μL 10⁻¹ 加到 10ml 无菌水里 成为 10⁻⁴）

注意：激素不可以高压蒸汽灭菌（会分解）为保证无菌，SA 与 GA₃ 用酒精配置即可，EDTA 需用无菌水配置或过细菌滤膜（该步骤需使用注射器 注意安全）



激素要现用现配，（但是 EDTA 可以在冰箱里保留一段时间），配置时往往不需要无菌，在试管盒（如下图）中取干净的试管，洗洗用就好（节约昂贵无 RNA 酶管子），激素不可以送去灭菌



1.5 无菌操作:

- 紫外线消毒 15min: 所有除活体外所用器材 (千万不要给微萍等生物照紫外线)
- 戴手套, 喷酒精 (75%医用)
- 开通风 (低档风)
- 点酒精灯
- 开瓶时过火焰
- 暂时不用立即盖盖
- 完成后擦桌: 75%酒精

注意: 严格的无菌操作是实验成功的关键一步! 需要严格小心手以及未经过高压蒸汽灭菌 (紫外灯照过不算灭菌) 的任何物品接触到无菌材料。具体包括: 尽量在酒精灯火焰附近操作、手不要晃过或者触摸敞开的瓶口 (各种瓶口也尽量不要敞开 用完立刻封好口)、枪不要接触瓶口和液体 (尽量用枪头接触)、超净台内使用镊子、剪刀等时需要频繁灼烧

使用酒精灯注意安全

1.6 实验记录

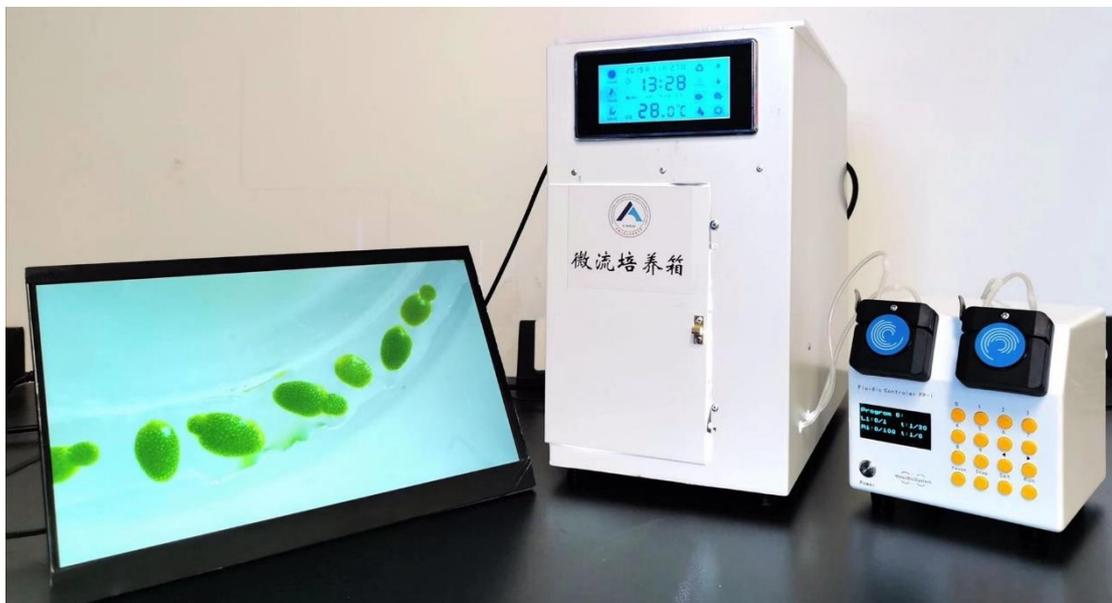
(1) 严谨详实的实验记录非常重要, 需要及时落实在记录本上以随时查看。具体需要包括, 实验日期、人员、条件、试剂种类信息、具体数据等, 辅助以必要的照片、图片等记录。

(2) 当实验现象与预期不符时, 需要对可能出现的问题进行分析, 改变、排除所有实验条件, 再进行重复。例如经激素诱导的微萍没有重复此前的开花现象, 应仔细排除培养基、激素、培养箱、微萍状态等对其的影响, 再分析其它可能。

2.微流培养体系使用

2.1 微流及其培养体系仪器介绍

2.1.1 培养体系



从右向左依次由微流泵（使培养皿内部液体流动）、培养箱（控制培养条件）以及显示屏组成，显示屏连接电脑，可利用相关软件实时追踪拍摄。

2.1.2 微流泵

蠕动泵(1-2)：可控制流体的输送由泵头及软管组成，根据马达的转动方向调节流体的传输方向

液晶显示屏(3)：用于实时监控设备各参数，按 set 键设置 run 键运行

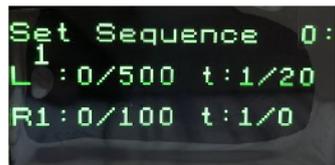


参数设置：说明书

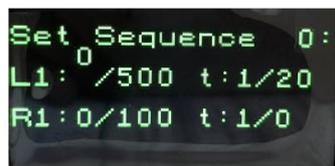
脱机参数设置

用户根据实验需求，可直接通过面板按键操作修改 0-7 号键对应的序列参数。具体操作如下：

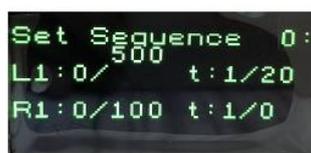
1. 按键选择 0-7 号按键中的任一序列；
2. 按 Set 键，L 泵方向选择数字即上移，如需更改泵旋转方向，可按键设定 0 或 1 修改；



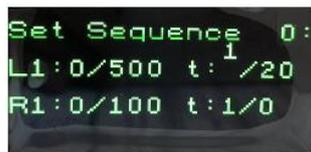
3. 按 Run 键，脉冲单元间隔时间单位数字上移，可按键设定 0-3 修改脉冲单元间隔时间单位（0: 毫秒；1: 秒；2: 分； 3: 小时）；



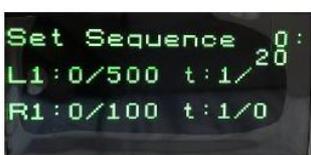
4. 按 Run 键，脉冲单元间隔时间数字上移，可按键设定修改冲单元间隔时间数字（最小值 10）；



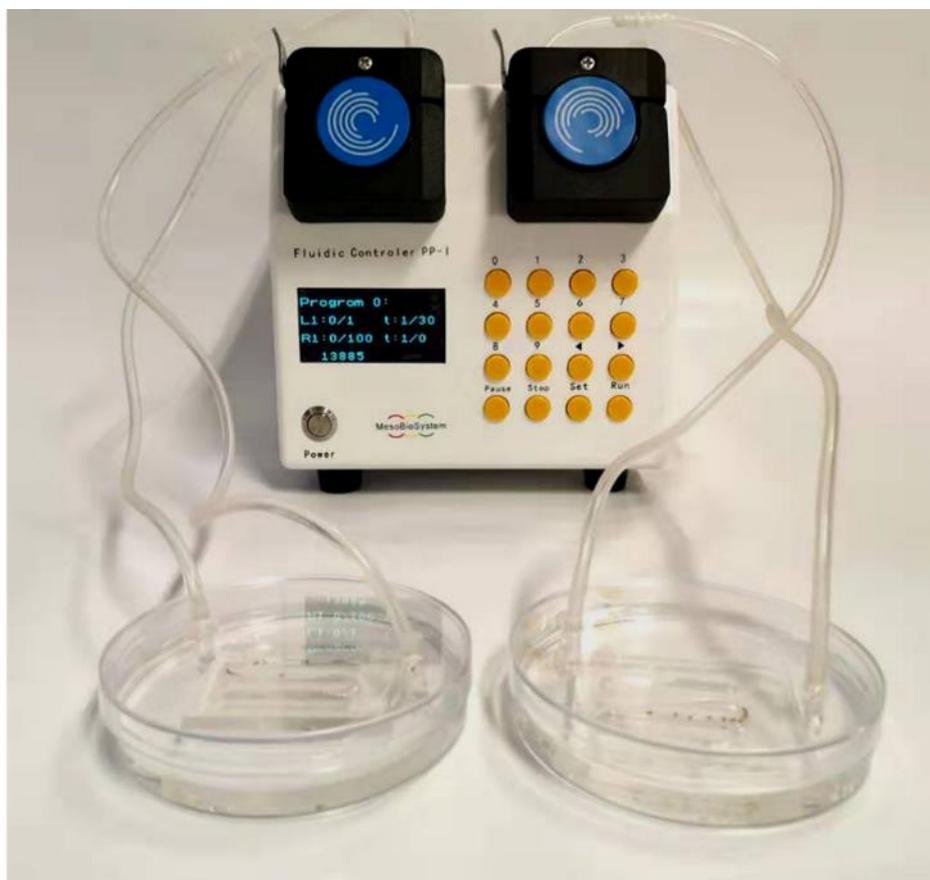
5. 按 Run 键，泵运行时间单位数字上移，可按键设定 0—4 修改泵运行时间单位（0：毫秒；1：秒；2：分；3：小时；4：天）；



6. 按 Run 键，泵运行时间数字上移，可按键设定修改泵运行时间；

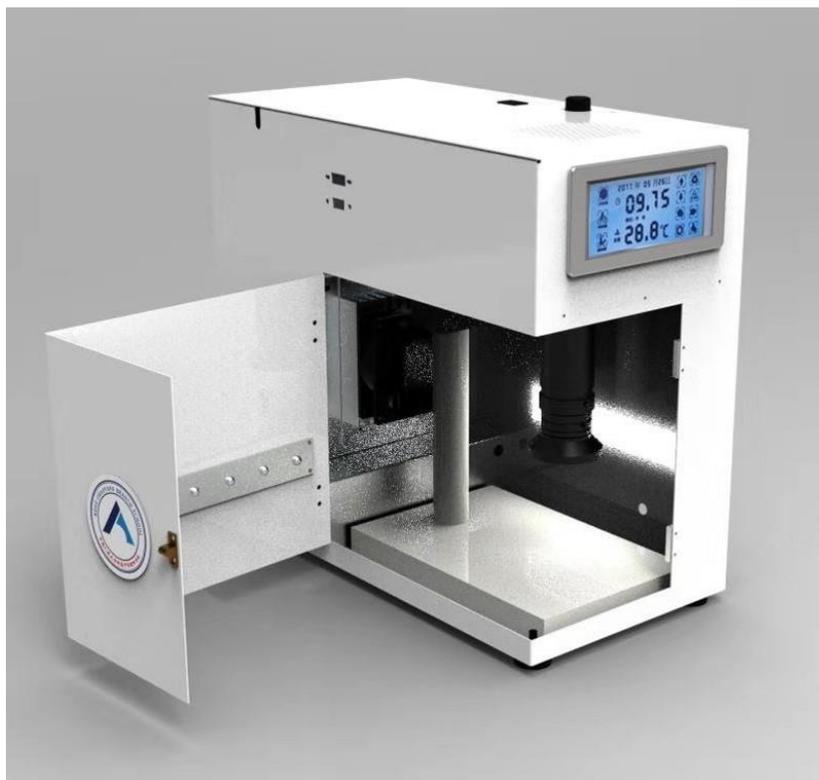


7. 按 Run 键，进入右泵参数设置，设置方式同上；
8. 当设定完右泵运行时间，按 Run 键后，系统将自动保存设置参数；
9. 参数设置完成，按 Run 键后，系统将执行参数修改后的序列。

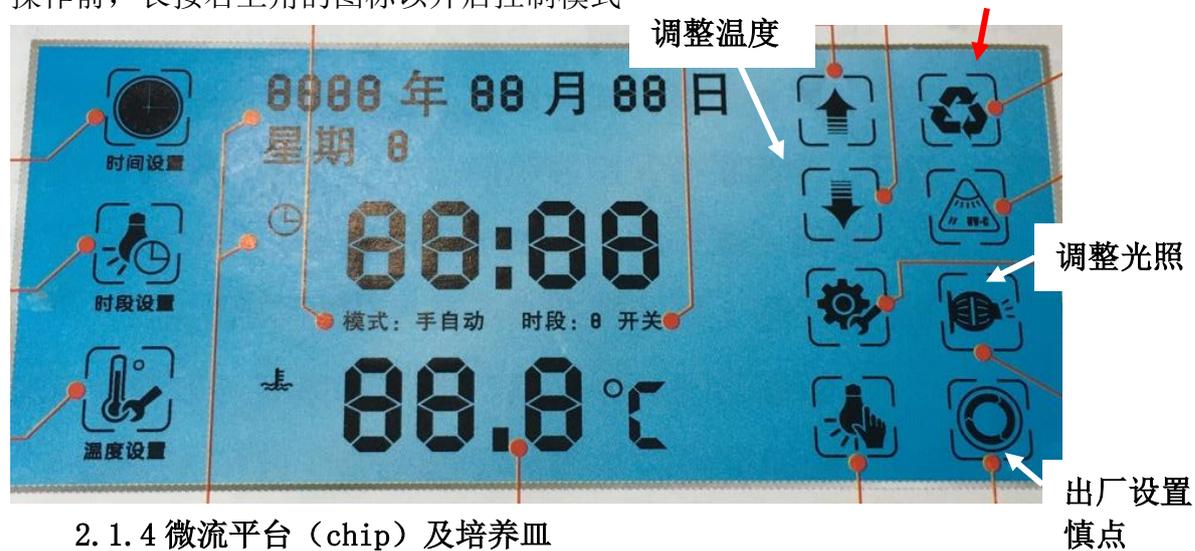


微流泵与培养皿的连接方式

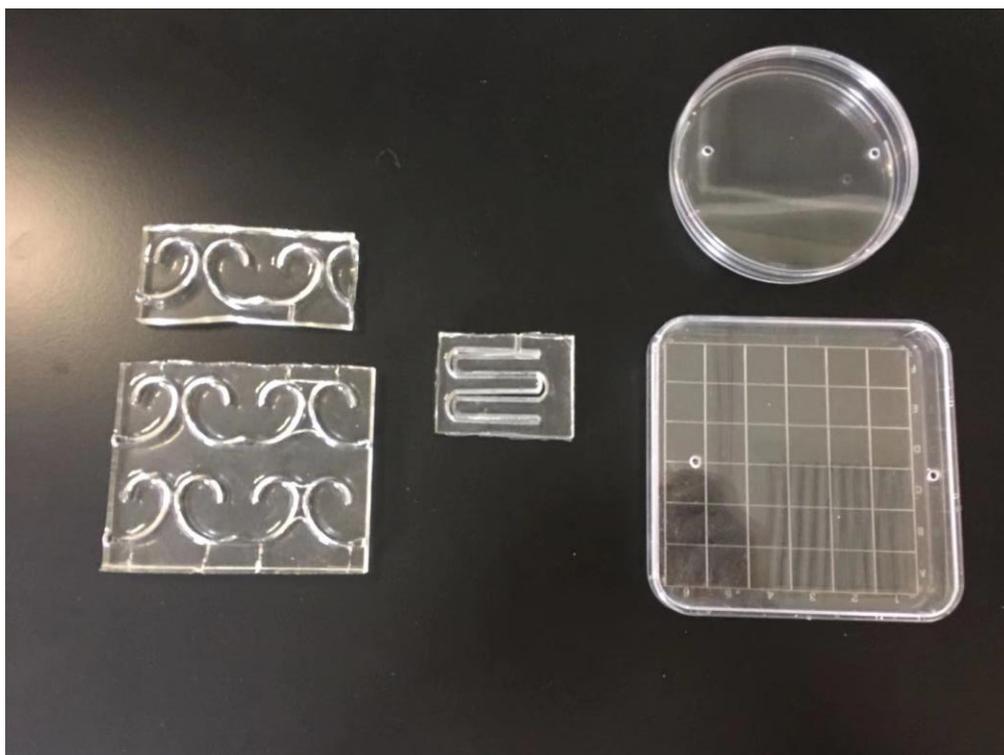
2.1.3 培养箱



通过触屏面板主要控制箱内温度、光照时间等操作前，长按右上角的图标以开启控制模式



2.1.4 微流平台 (chip) 及培养皿

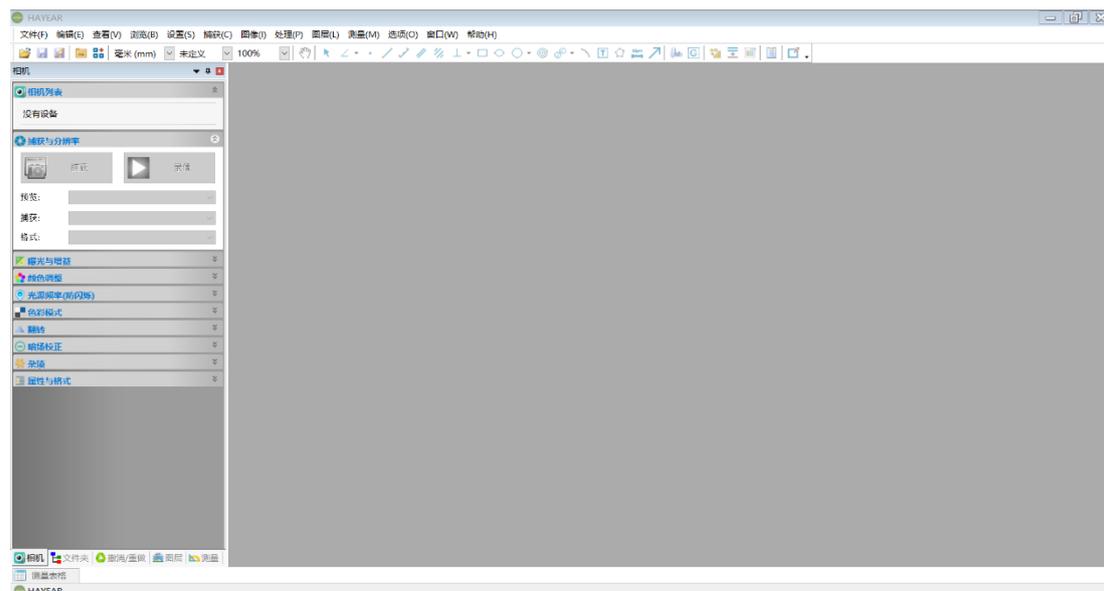


左-右依次为弧形微流平台（上下分别适用于圆形和方形培养皿）、直道微流平台、两种培养皿（盖子需打直径 2.2mm 的空以便通过连接管子的插头）

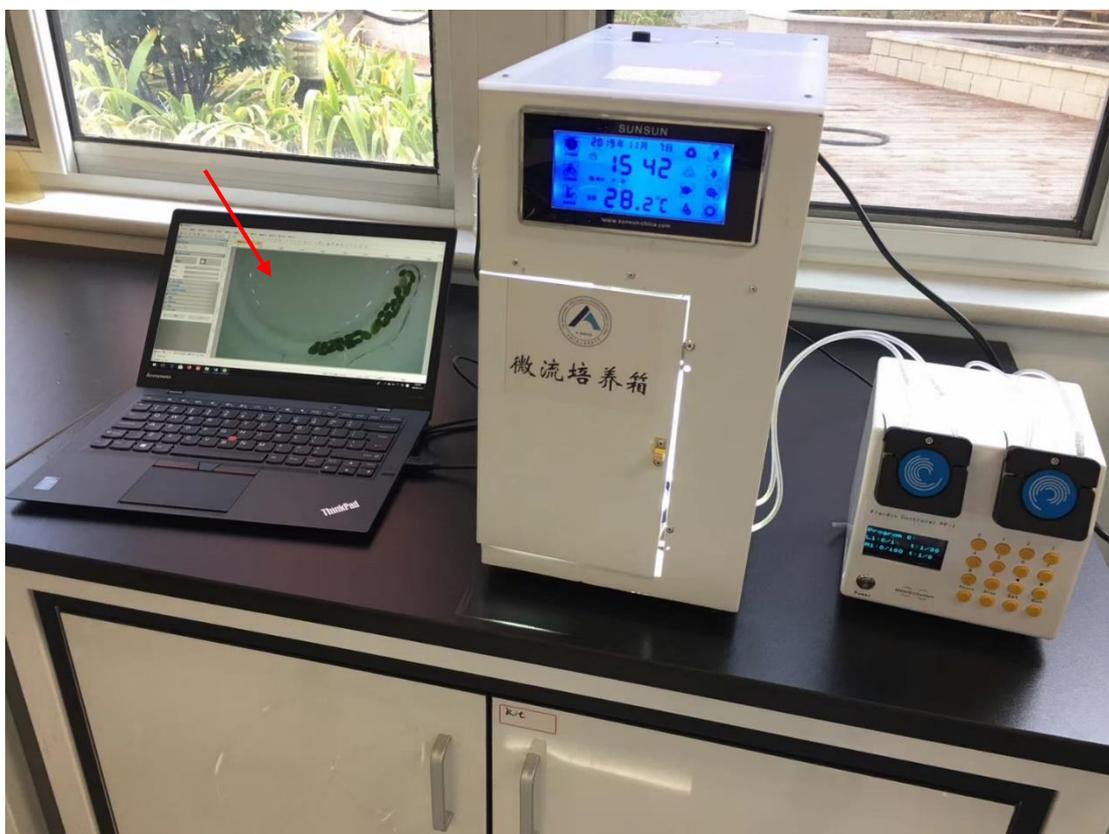
2.1.5 拍摄软件

- (1) 拍摄前，将有关电脑通过 USB 口与培养箱-显示屏相连。
- (2) 打开软件 HAYEAR（绿色图标）

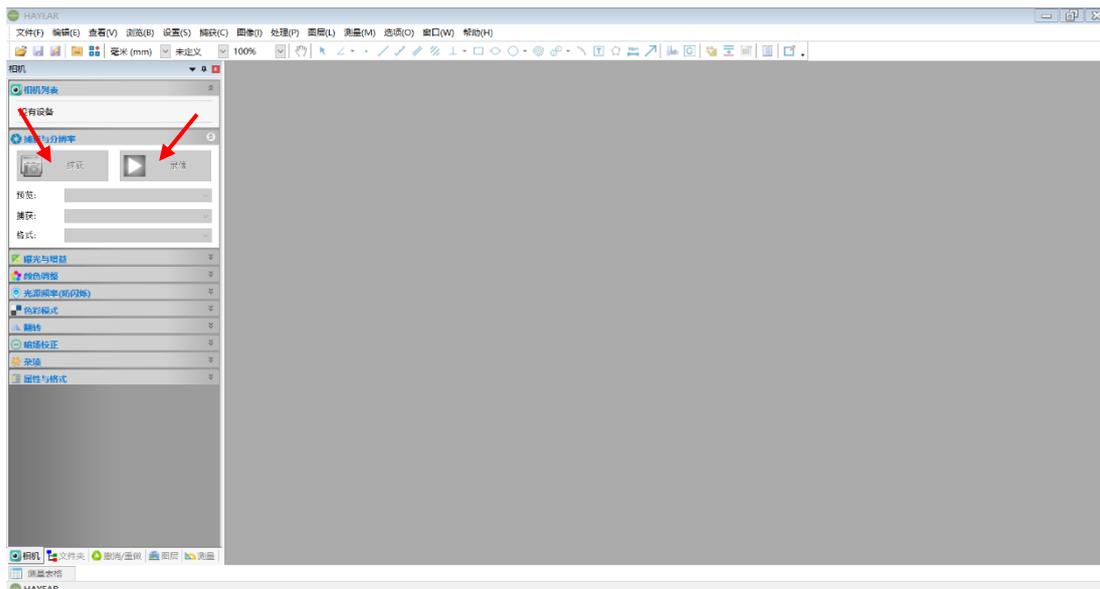




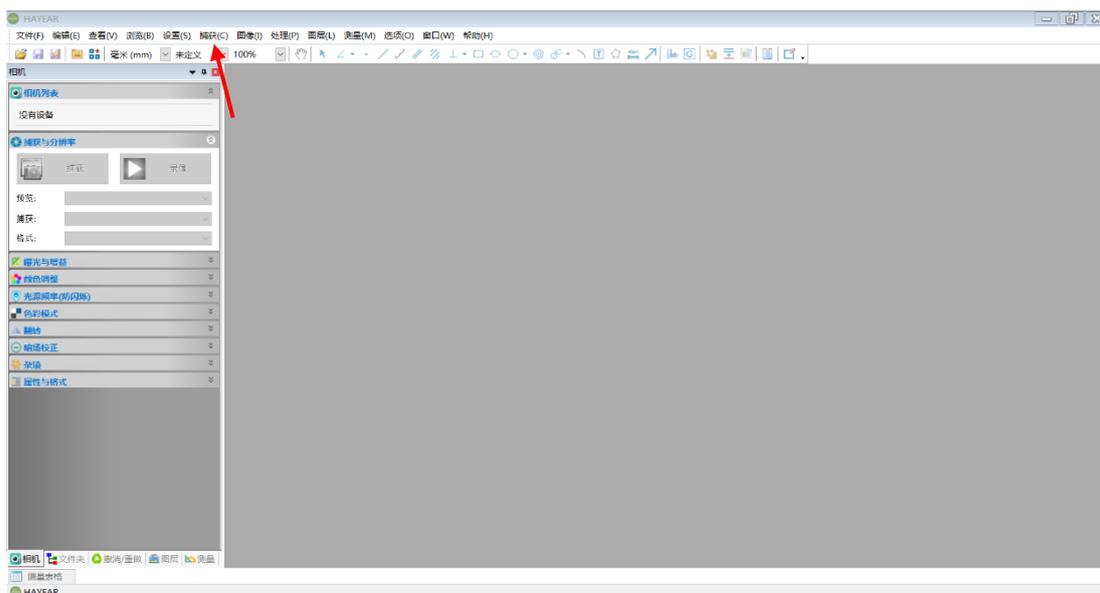
(3) 在相机列表中找到“我的设备”，并点击，可看到与显示屏形同的画面



(4) 点击“捕获”即可快速拍照并选择保存路径，点击录像即可录制视频



(5) 延时摄影：点击菜单栏中“捕获”选项，找到“开始定时捕获”选项（图标是小时钟），设置拍照时间间隔、帧数、保存路径等即可。该捕获结果为一系列图像，需用软件将其剪辑连缀为视频。



2.2 使用流程（注意无菌操作）

(1) 清洗干净微流平台：

尤其注意清洗沟槽内部 否则灭菌后会有污迹



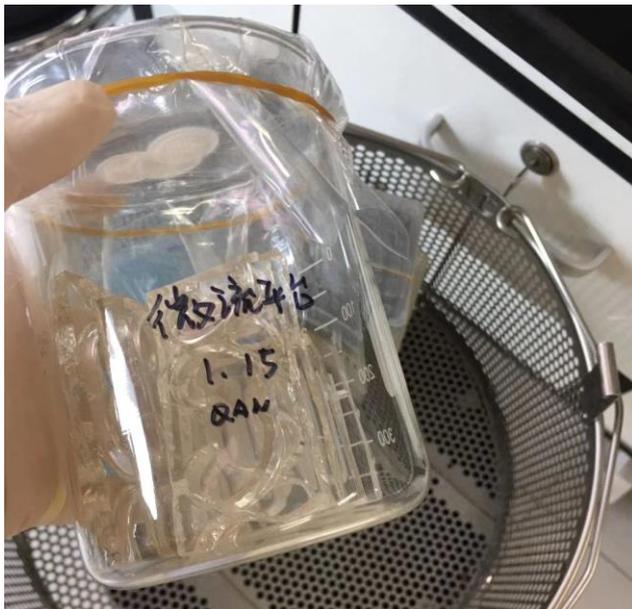
(2) 将微流平台+管子（两长一短、以白色连接头连接）+管子与平皿的接口，分别放置在清洗干净的烧杯中，用两层封口膜、两层皮筋封口。



两长+一短塑料管 用白色连接头接好后放入烧杯灭菌



箭头指示塑料管与培养皿接头以及塑料管



灭菌前标注好灭菌物品、日期、姓名等

(2) 在微流平台上种微萍（以下全部操作均在超净台中完成!）

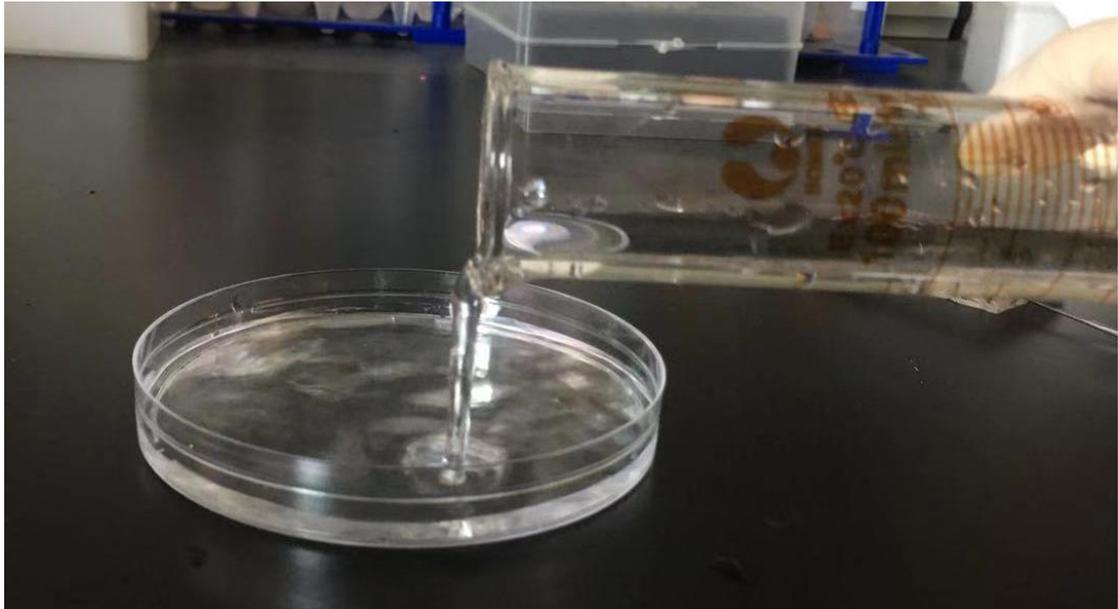
1) 准备齐材料、照紫外（只能杀死表面微生物，不可代替对培养基、微流平台等的高压蒸汽灭菌）

- 培养基
- 培养皿
- 量筒
- 酒精灯
- 镊子
- 微流平台、管子、接头等
- 酒精棉球和酒精
- 移液枪（不同浓度）
- 激素

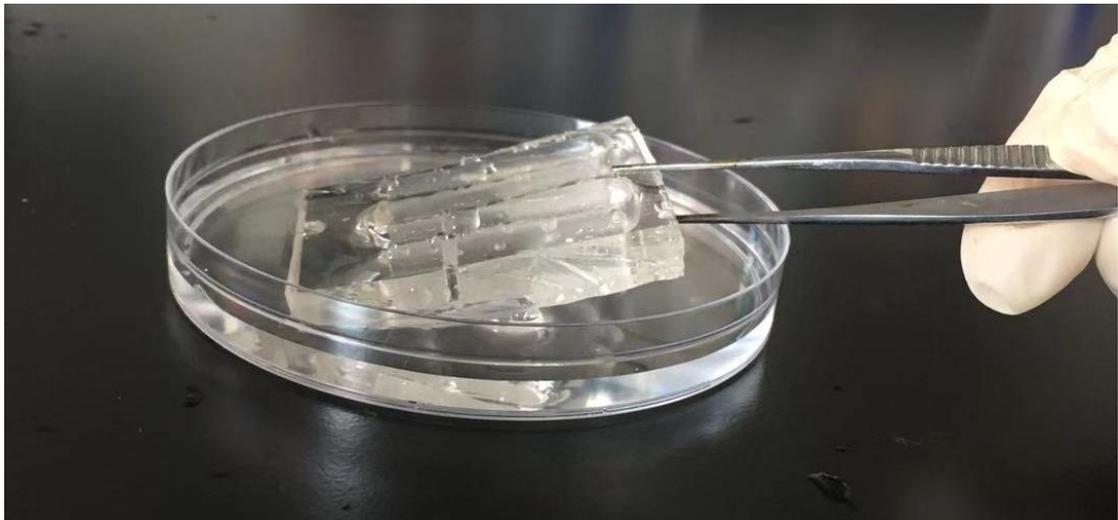
没有微萍！没有微萍！没有微萍！



2) 用酒精棉球擦拭打好孔的培养皿盖，在超净台的过滤风里确保全部挥发

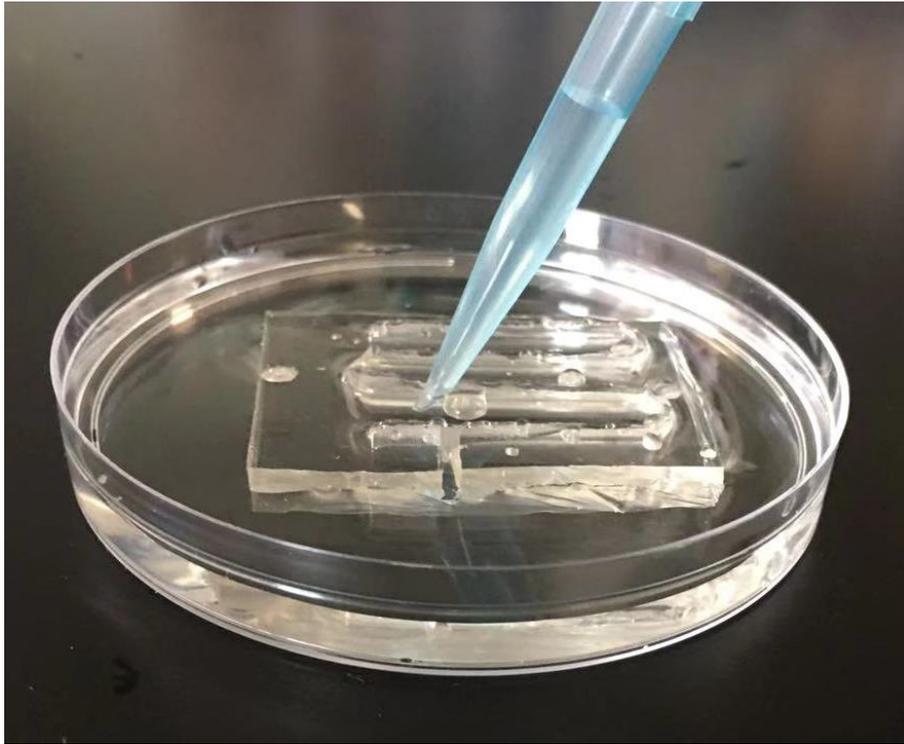


3) 加入培养基（个人经验 30ml 为宜）和激素

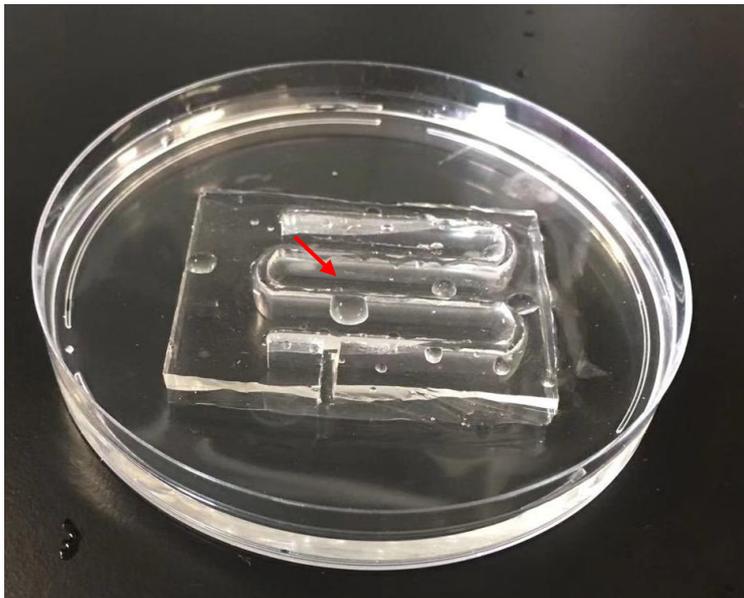


4) 用反复灼烧过的镊子夹入并尽量固定一个灭菌后的微流平台

注意：放入尽量快 减少灭菌不彻底的镊子与无菌材料的接触；若微流平台漂浮，则用枪头将其尽量向下按，否则微藻易漂出；若还无法按住，可能是培养基过多，建议吸出一些。

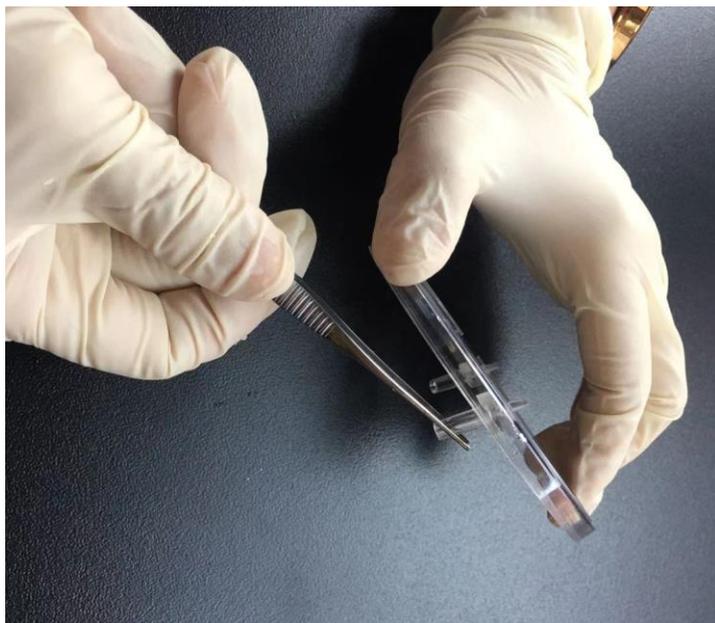


5) 在沟槽中注入一些液体（使微藻更容易漂起来）并用枪头吸取一个带分支的微藻轻轻放入沟槽中，检查其是否接触槽内液体

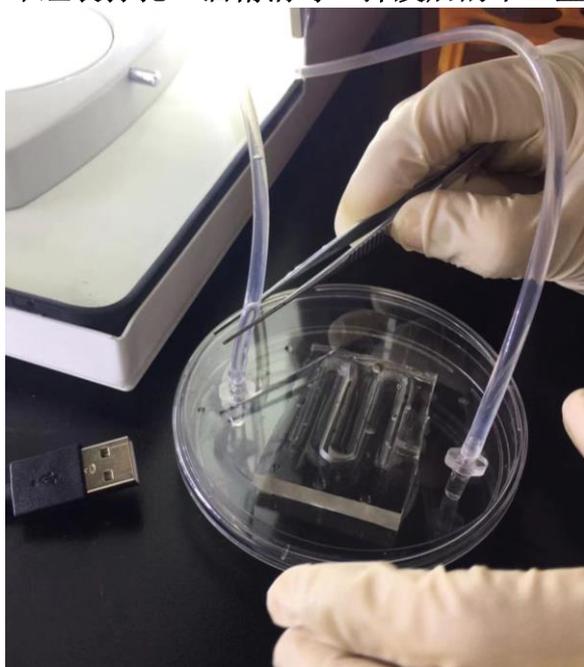


6) 完成后适当清理（用枪吸走）一下沟槽外的水珠，避免影响拍摄

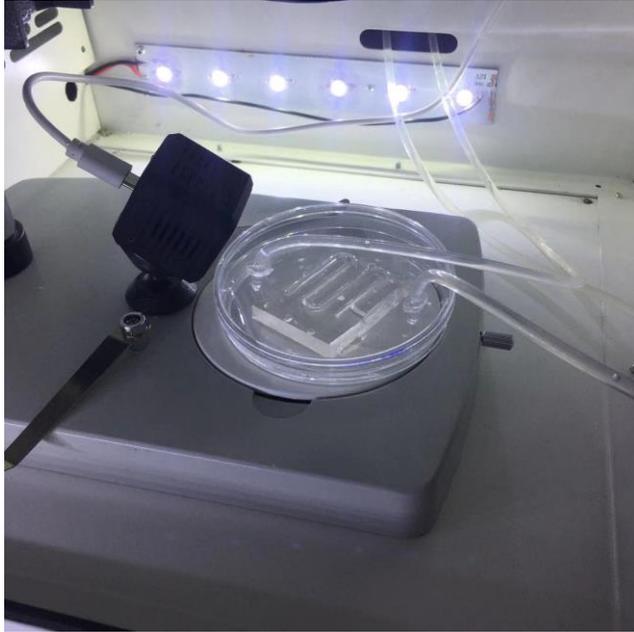
(4) 将培养箱相关连接管等与培养皿进行组装



1) 组装打孔、酒精消毒、挥发后的平皿盖和灭菌后的连接头



2) 组装连接头和塑料管子的两头（此步及以上步骤均需在超净台完成 忽略拍摄原因）封好口 并将连接好的管子和培养皿小心移至培养箱-蠕动泵系统旁边（防止水流晃动将沟槽中微藻冲出）



2) 将培养皿放入培养箱内，将塑料管与蠕动泵连接好（使用螺丝刀卸下蠕动泵前的一部分 这一步请在老师指导下操作）其间不需要拆开连接好的整条塑料管

（5）拍摄

设置好培养箱相关参数，连接好拍摄软件连续拍摄。

3. 注意事项

1. 做以上任何实验，请佩戴手套
2. 使用灭菌锅前务必检查两个水位，注意安全
3. 使用灭菌锅时，尽量一次性多灭菌些材料，记得每次要灭量筒，记得有些材料不可以灭菌（培养皿和塑料管子会熔化/变形，激素会分解）
4. 移动过程中务必小心微萍漂出，观察、记录实验材料的数据越频繁越好，一定会有收获
5. 需要进行无菌操作的步骤务必保证无微生物污染，使用酒精灯千万不要乱碰灯芯，学会使用超净台旁边的灭火毯
6. 做好实验记录，否则会有血的教训 (bushi)

祝：巧手实验数据有 妙笔文章拒稿无

一切顺利！

