



华中农业大学
生物质与生物能源研究中心

实验操作手册

2018年6月制

编者名单

主编：黄江锋 李丰成

编委：范春芬 李 英 胡慧贞 李 傲

孙 丹 汪 洋 胡 振 徐成宝

王金彤 张 冉 张贵粉 朱晓博

吴雷明 杨巧梅 刘 鹏 靳晓焕

李先良 吕政熠

责编：王艳婷 涂媛苑

目 录

分子克隆	1
DNA 提取	1
RNA 提取	2
基因表达分析	5
载体构建（常规）	6
Gateway 系列载体构建	12
单位点 CRISPR 载体构建	13
多位点 CRISPR 载体构建	15
农杆菌操作	18
转基因操作	20
水稻转基因	20
拟南芥转基因	23
洋葱表皮细胞瞬时转化	23
分子标记	25
蛋白、生化分析	27
蛋白质原核表达	27
抗体制备与纯化	28
Brandford 法测定蛋白浓度	29
膜蛋白提取与分离	30
免疫共沉淀（CO-IP）	30
SDS-PAGE	31
Western blot	32
纤维素体外合成	33
纤维素酶活性测定	34
β -葡萄糖苷水解酶活性测定	35
酵母双杂交	35
染色质免疫共沉淀（ChIP）	38
细胞学实验	42

琼脂糖包埋震动切片.....	42
石蜡包埋半薄切片.....	42
树脂包埋超薄切片.....	43
叶片细胞形态学观察.....	43
纤维素染色观察.....	44
木质素染色观察.....	44
多糖抗体免疫荧光观察.....	44
多糖量子点免疫荧光观察.....	45
拟南芥种子果胶质免疫荧光观察.....	46
胼胝质测定与观察.....	46
GUS 染色观察.....	47
水稻原生质体分离与激光共聚焦观察.....	47
扫描电镜观察.....	48
透射电镜观察.....	49
原子力显微镜观察.....	49
水稻农艺性状分析	51
机械力学性状考察.....	51
水稻考种.....	51
稻米品质测定.....	52
淀粉含量测定.....	53
光合速率测定.....	55
稻瘟病抗性分析.....	55
白叶枯病抗性鉴定.....	56
褐飞虱抗性鉴定.....	56
植物细胞壁成分分析	58
细胞壁多糖提取.....	58
比色法测戊糖、己糖和糖醛酸.....	60
硅含量测定.....	61
提取粗纤维素.....	62

纤维素聚合度测定.....	62
纤维素还原端分析.....	64
纤维素结晶度测定.....	64
木质素总量测定.....	64
木质素单体分析.....	65
键连接分析.....	67
乙酰化分析单糖含量.....	67
硅烷化分析.....	69
甲基化分析.....	70
2-AB 衍生化分析.....	70
GCMS 测定可溶性糖.....	71
生物质降解效率分析.....	72
碱预处理及酶解.....	72
酸预处理及酶解.....	72
液体热水预处理及酶解.....	73
CaO 预处理及酶解.....	74
蒸汽爆破预处理.....	74
表面活性剂的添加及酶解.....	74
生物质发酵产乙醇分析.....	76
乙醇发酵.....	76
乙醇含量测定.....	76
细胞壁孔径分析.....	78
Simons' Stains 方法测定孔隙度.....	78
刚果红染色测定纤维素孔隙度.....	79
纤维素酶吸附法.....	79
氮气法测定孔隙度.....	80
诱导产纤维素酶.....	84
孢子液的制备.....	84
秸秆材料诱导里氏木霉或草酸青霉产纤维素酶.....	84

诱导酶液活性测定.....	85
酵母遗传操作	87
酿酒酵母感受态细胞的制备及转化.....	87
酿酒酵母基因组 DNA 提取.....	88
重金属操作	90
吸附实验.....	90
溶液中镉含量的测定.....	93
秸秆中镉含量测定.....	94

分子克隆

DNA 提取

◇ 水稻 DNA 提取

- (1) 取水稻嫩叶 2 cm 左右放入 1.5 mL 离心管中，用液氮研磨充分破碎细胞；
- (2) 加入 650 μL 1.5 \times CTAB，用牙签混合均匀；
- (3) 65°C 水浴 30 min，每 5-10 min 摇动一次；
- (4) 取出离心管，室温放置 10 min，加入 650 μL 等体积氯仿；
- (5) 充分混匀，摇动 15 min。室温放置 2 min，12000 r/min，离心 10 min；
- (6) 取 400 μL 上清液转入到新离心管中（注意不要吸取下层杂质），加入等体积，400 μL 异丙醇；
- (7) 摇动 3 min，室温放置 2 min，12000 r/min 离心 8 min；
- (8) 弃上清，加入 75% 乙醇 800 μL ，上下颠倒 3 次；
- (9) 弃上清，再加入 75% 乙醇 800 μL ，上下颠倒 3 次，7500 r/min 离心 2 min；
- (10) 弃上清，用 10 μL 移液器充分吸除 75% 乙醇，晾干；
- (11) 加入 50 μL ddH₂O。

◇ 拟南芥 DNA 提取

- (1) 取 0.1 g 拟南芥幼叶，在 600 μL CTAB 提取液中均匀研磨，转至 1.5 mL 离心管；
- (2) 65°C 水浴 30 min，每 10 min 摇动 1 次；
- (3) 冷却至室温后，加入等体积的氯仿-异戊醇 (v: v/24: 1)，轻柔摇匀 10 min；
- (4) 室温，12000 r/min，离心 10 min；
- (5) 转移上清，加入等体积异丙醇，室温放置 10 min；
- (6) 室温，12000 r/min，离心 10 min；
- (7) 弃上清，75% 乙醇洗涤沉淀；
- (8) 沉淀晾干，用 50 μL TE 溶解，-20 °C 保存。

◇ 棉花 DNA 提取

- (1) 取 0.5 g 棉花幼叶，在液氮中迅速研磨成粉；
- (2) 加入 3 mL 65°C 预热的 CTAB 提取液，快速振荡混匀，65°C 水浴 30 min；
- (3) 于离心管中加入 1 mL 5 mol/L KAc，混匀，冰浴 20 min 后，用等体积的氯仿：异戊醇（24：1）抽提 1 次；
- (4) 4°C 12000 r/min 离心 5 min，取上清；
- (5) 加入 2/3 倍体积的 -20°C 预冷异丙醇，混匀，-20°C 静置约 30 min；
- (6) 用牙签挑出絮状沉淀，用 75% 的乙醇反复漂洗 3 次，再用无水乙醇漂洗 1 次，风干；
- (7) 将沉淀重溶于 400 μ L TE 中，加入 1 μ L RNaseA (10 mg/L)，37°C 处理 1 h；
- (8) 用酚：氯仿：异戊醇（25：24：1）和氯仿：异戊醇（24：1）各抽提 1 次，每次均 4°C 12000 r/min 离心 5 min；
- (9) 取上清，加入等体积的异丙醇，-20°C 放置约 30 min，12000 r/min 离心 5 min；
- (10) 弃上清，沉淀用 75% 乙醇漂洗，干燥后溶于 200 μ L TE 中，-20°C 保存。

RNA 提取

◇ 水稻 RNA 提取

- (1) 称取 0.1 g 样品（约为 1.5 mL 离心管 500 μ L 刻度处），用液氮研磨成粉末，加入 1 mL Trizol，涡旋振荡混匀，室温放置 3 min；
- (2) 4°C，12000 r/min，离心 10 min，取上清液加入 0.2 mL 氯仿，剧烈振荡 15 sec，室温放置 3 min；
- (3) 4°C，12000 r/min，离心 10 min，取上清液加入等体积异丙醇，上下颠倒混匀，室温放置 10 min；（或上清液加入 2 倍体积无水乙醇，上下颠倒混匀，冰箱放置 30 min 以上）；
- (4) 4°C，12000 r/min，离心 10 min，弃去上清，用 70% 乙醇（乙醇：DEPC 水=7：3）洗涤沉淀两次；
- (5) 室温干燥 RNA，加 30-50 μ L 的 DEPC 水溶解 RNA，-80°C 保存；

(6) 利用 DNase I 消化溶液中的 DNA;

在 1.5 mL 离心管中配置下列反应液, 共 50 μL :

试剂	体积 (μL)
总 RNA	20-50 μg
10 \times DNase I buffer	5.0
DNase I (RNase-free, 5 U/ μL)	2.0
RNase Inhibitor (40 U/ μL)	0.5
DEPC ddH ₂ O	Up to 50

37°C 反应 30 min;

(7) 将反应液加 DEPC 水扩大到 400 μL , 加入等体积氯仿, 剧烈振荡 15 sec;

(8) 4°C, 12000 r/min, 离心 10 min, 上清液加入等体积异丙醇, 上下颠倒混匀, 室温放置 10 min;

(9) 4°C, 12000 r/min, 离心 10 min, 弃去上清, 用 70% 乙醇 (乙醇: DEPC 水 = 7: 3) 洗涤沉淀两次;

(10) 室温干燥 RNA, 加 30-50 μL 的 DEPC 水溶解 RNA, -80°C 保存。

✧ 拟南芥 RNA 提取

(1) 拟南芥样品约 0.1 g, 加入 1 mL Trizol, 在冰上充分研磨后装入 1.5 mL 离心管中, 室温放置 3 min;

(2) 加入 200 μL 氯仿, 剧烈振荡, 放置 3 min;

(3) 4°C, 12000 r/min, 离心 10 min;

(4) 取上清, 加入等体积异丙醇, 轻柔混匀, 室温放置 10 min;

(5) 4°C, 12000 r/min, 离心 15 min;

(6) 弃上清, 用 70% DEPC 乙醇洗涤沉淀 2 次;

(7) 室温干燥 RNA, 加 50 μL 溶解液, 60°C 水浴溶解 10 min 后, -80°C 保存。

✧ 棉花 RNA 提取

【CTAB-PVP 法】

(1) 从 -80°C 冰箱中取出材料并放入研钵中, 加入液氮, 研磨样品, 每个 10 mL 离心管中加入 0.2~0.5 g 材料, 并置于冰上;

- (2) 加入 4 mL 65°C 预热的提取缓冲液和 80 μ L β -巯基乙醇, 充分震荡离心管, 65°C 温浴 10 min, 其间震荡离心管 2~3 次;
- (3) 4°C 12000 g 离心 10 min。取上清液转移至新的 10 mL 离心管中, 用等体积的氯仿: 异戊醇 (24 : 1) 抽提 2 次, 每次充分震荡, 冰上放置 10 min, 4°C 12000 g 离心 10 min;
- (4) 转移上清, 加入等体积的异丙醇轻轻混匀, -20°C 0.5 h 沉降 RNA, 4°C 12000 g 离心 10 min, 弃去上清液;
- (5) 加 500 μ L 70% 冰冷乙醇洗涤沉淀 2 次, 离心去上清, 干燥沉淀;
- (6) 加入 44 μ L DEPC 处理的无菌水溶解;
- (7) 加入 600 μ L DEPC 处理的无菌水后, 用等体积的苯酚: 氯仿: 异戊醇 (25 : 24 : 1) 和等体积的氯仿: 异戊醇 (24 : 1) 各抽提 1 次, 每次充分震荡, 放置 10 min, 4°C 12000 g 离心 10 min;
- (8) 取上清液, 上清加入等体积的异丙醇, -20°C 沉降 30 min;
- (9) 4°C 12000 g 离心 10 min, 弃掉上清, 加 1 mL 70% 冰冷乙醇洗涤沉淀两次;
- (10) 干燥沉淀, 加入适量无 RNase 的水溶解 RNA, 样品置于 -80°C 保存备用。

【热硼酸法】

- (1) 将提取缓冲液 (200 mmol/L 硼酸钠 (pH 9.0), 30 mmol/L EGTA, 10 mmol/L DTT, 1% SDS, 1% DOC (脱氧胆酸钠) 和 2% PVP-40) 在 80°C 预热 10 min;
- (2) 在液氮中将棉花纤维研磨成粉末, 称取 1.0 g;
- (3) 加入 5 mL 预热过的提取缓冲液, 50 μ L 100 mmol/L DTT, 匀浆 2 min;
- (4) 加入 200 μ L 蛋白酶 K (20 mg/mL) 混匀, 42°C, 摇床 100 r/min, 温育 1.5 h;
- (5) 加 2 mol/L KCl, 至终浓度 160 mmol/L, 冰上放置 1 h;
- (6) 4°C, 12000 r/min, 离心 20 min 后, 将上清液移入新离心管;
- (7) 加入 1/3 体积的 8 mol/L LiCl, 至终浓度 2 mol/L, 4°C 沉淀至少 5 h;
- (8) 4°C, 12000 r/min, 离心 20 min, 弃上清;
- (9) 用 4°C 预冷的 2 mol/L LiCl 洗涤沉淀 2-3 次, 每次洗涤后 4°C, 12000 r/min, 离心 12 min;

- (10)用 800 μL DEPC 处理的无菌水充分溶解沉淀；
- (11)4 $^{\circ}\text{C}$ ，13000 g，离心 10 min，将上清转移到新的离心管；
- (12)加 2 mol/L KAc 至终浓度 200 mmol/L，冰上放置 15 min 后，4 $^{\circ}\text{C}$ ，13000 g 离心 10 min，将上清转移于新的离心管；
- (13)每管加 2.5 倍体积的无水乙醇，混匀后，放入-80 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀 1 h；
- (14)4 $^{\circ}\text{C}$ ，12800 r/min，离心 15 min。用预冷的 70%乙醇洗涤 2 次，每次 13000 g，离心 4 min。加入 40 μL 灭菌水 60 $^{\circ}\text{C}$ 溶解。

基因表达分析

◇ 反转录合成第一链 cDNA

按照 Promega 的反转录酶体系进行操作。实验步骤如下：50 μL 体系

试剂	体积 (μL)
RNA	4 μg
Oligo dT primer (10 $\mu\text{mol/L}$)	5.0
DEPC dd H ₂ O	Up to 25

混匀，70 $^{\circ}\text{C}$ ，水浴 5 min；立刻冰浴 3 min。加入下列试剂：

试剂	体积 (μL)
5 \times M-MLV Buffer	10.0
dNTPs Mix (10 mmol/L)	2.5
RNase inhibitor (50 U/ μL)	1.0
M-MLV (200 U/ μL)	1.0
DEPC ddH ₂ O	25.5

混匀，42 $^{\circ}\text{C}$ ，保温 1 h。反转录后的 cDNA 保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 。

◇ RT-PCR

- (1) 将 cDNA 按照一定的比例稀释后，利用泛素蛋白基因 (Ubiquitin) 作为内参，以内参引物 (Ubi) 进行 PCR 扩增。
- (2) 利用 Image Lab 软件对电泳条带进行初步定量分析，并按照条带亮度的数值，调整模板 cDNA 的稀释比例。直到各利用 Ubi 引物进行 PCR 扩

增的条带亮度一致。

- (3) 利用上述调整好的 cDNA 为模板，以各基因特异的引物，进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系如下：

试剂	体积 (μL)
cDNA	8.0
Primer-F (10 $\mu\text{mol/L}$)	1.0
Primer-R (10 $\mu\text{mol/L}$)	1.0
2 \times EasyTaq Mix	10.0

PCR 反应条件：94 $^{\circ}\text{C}$ ，5 min；94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 sec；58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 sec；72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 sec，30 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min；4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

◇ qRT-PCR

将 cDNA 稀释一定倍数后做为模板，使用 SYBR Green qPCR 试剂盒（庄盟试剂公司）在 MyiQ2 (BIO-RAD, USA) 进行实时定量 PCR 检测。以水稻中的泛素蛋白基因 Ubiquitin (AK059011) 为内参，荧光种类选择 SYBR Green1，每个基因做 3 个技术重复，扩增体系 20.0 μL ：

cDNA	8.0 μL
2 \times SYBR Green1 Mix	10.0 μL
Primer-F	1.0 μL
Primer-R	1.0 μL

反应程序：95 $^{\circ}\text{C}$ ，2 min；95 $^{\circ}\text{C}$ ，15 sec，60 $^{\circ}\text{C}$ ，15 sec，72 $^{\circ}\text{C}$ ，25 sec，40 个循环；55 $^{\circ}\text{C}$ -95 $^{\circ}\text{C}$ ，81 个循环。

载体构建（常规）

◇ 引物设计

- (1) 检索基因序列：从 NCBI 或者利用不同物种特异的数据库检索目标基因的序列信息。
- (2) 利用 Primer 5 等软件设计扩增目标基因的引物，注意以下事项：
 - (a) 引物长度一般在 15~30 碱基之间

- (b) 引物 GC 含量在 40%~60%之间
- (c) 引物 3'端不能选择 A，最好选择 T
- (d) 引物自身及引物之间不应存在互补序列
- (e) 引物应具有特异性，引物设计完成以后，应对其进行 BLAST 检测。
如果与其它基因不具有互补性，就可以进行下一步的实验了

◇ PCR 扩增

基因克隆用 KOD Plus 扩增，体系如下：

试剂	加样量 (μL)
Template DNA	2.0
10 × Buffer	2.0
2.5 mmol/L dNTPs	2.0
10 μmol/L Forward Primer	0.5
10 μmol/L Reverse Primer	0.5
KOD Plus (1 U/μL)	1.0
25 mmol/L MgSO ₄	1.0
ddH ₂ O	up to 20

PCR 反应参数：

温度 (°C)	时间	循环数 (cycles)
95	5 min	1
95	30 s	30
(T _m -5)	30 s	30
68	1 kb/min	30
68	10 min	1
25	5 min	1

◇ DNA 片段的加尾、补平及去磷酸化

◆ 基因片段 3'末端加 A 反应

用 KOD plus 高保真酶 PCR 扩增得到片段 3'末端不含碱基 A，因此构建

TA 克隆载体时需要在片段 3' 末端加 A，体系如下：

试剂	加样量 (μL)
PCR 产物	40
10×Easy Taq Buffer	5.0
dATP	1.0
Easy Taq DNA Polymerase (5 U/ μL)	1.0
ddH ₂ O	3.0

72°C, 30 min, 25°C, 5 min。

◆ DNA 片段的补平

粘性末端限制性内切酶单酶切 DNA 片段后，需要进行平端连接的片段需要补平粘性末端，体系如下，11°C 反应 30 min，75°C 失活 20 min。

试剂	加样量 (μL)
酶切产物	42.0
10 mmol/L dNTPs	2.0
T4 DNA polymerase	1.0
10×BSA	5.0

◆ DNA 片段的去磷酸化

(1) 在 1.5 mL 离心管中配制下列反应体系：

试剂	加样量 (μL)
DNA Fragments	40.0
10×Buffer	5.0
CIAP (10-30 U/ μL)	1.0
ddH ₂ O	up to 50

(2) 37°C 或 50°C 反应 30 min；

(3) 苯酚/氯仿/异戊醇 (25: 24: 1) 抽提 2 次；

(4) 氯仿/异戊醇 (24: 1) 抽提 1 次；

- (5) 添加 5 μL 3 mol/L NaAC;
- (6) 添加 125 μL 的 (2.5 倍) 预冷无水乙醇, -20°C 静置 30-60 min;
- (7) 离心回收沉淀, 用 200 μL 的 70% 冷乙醇洗净后, 减压干燥;
- (8) 用 20 μL 以下 ddH₂O 溶解沉淀。

◇ DNA 片段回收

- (1) 用琼脂糖凝胶电泳将目的 DNA 片段与其他 DNA 片段分开, 用干净的手术刀切下所需要的琼脂块放入 1.5 mL 离心管中 (避免长时间的紫外照射);
- (2) 加入 RJ solution (每 100 mg 琼脂糖凝胶加 300 μL), $50-60^{\circ}\text{C}$ 水浴 5-10 min, 其间不断温和上下翻转离心管, 至胶完全融化;
- (3) 待溶液冷却后转移至吸附柱中, 室温放置 1 min, 7,000 r/min 离心 1 min;
- (4) 取下吸附柱, 将管底溶液重新加入到吸附柱重复 3 操作 1 次;
- (5) 倒尽管底废液, 加入 500 μL wash buffer, 7,000 r/min 离心 1 min;
- (6) 重复上述 5 操作 1 次;
- (7) 倒尽上述废液, 12,000 r/min, 空离 2 min, 以尽可能除尽 wash buffer, 室温晾干或超净工作台吹干;
- (8) 将吸附柱放入新的干净的 1.5 mL 离心管中, 于膜中央加入适量 (30~50 μL , 洗脱体积应不少于 30 μL) 事先预热好的 ddH₂O, 室温静置 3 min 左右, 以使 DNA 片段充分溶解;
- (9) 12,000 r/min, 离心 3 min。离心管底液体即为回收的 DNA 目的片段, 可立即使用或储存于 -20°C 。

◇ TA 克隆

- (1) 取 pMD18-T 载体 1 μL (50 ng), 加入等摩尔数 3' 末端已加 A PCR 产物;
- (2) 加入含 ATP 的 10 \times Buffer 1 μL , T4 DNA ligase (200 U/ μL) 0.3 μL , 用 ddH₂O 补足至 10 μL ;
- (3) 4°C 过夜连接, 转化 DH5 α 。

◇ 大肠杆菌感受态细胞制备

- (1) 从新活化的 *E.coli* DH5 α 菌平板上挑取一单菌落, 接种于 5 mL LB 液体培养基中, 37°C , 200 r/min 振荡培养 12 h 左右;

- (2) 将该菌悬液以 1: 100 转接于 100 mL LB 液体培养基中, 37°C 振荡扩大培养, 当培养液开始出现混浊后, 每隔 30 min 测一次 OD₆₀₀, 至 OD₆₀₀ ≤ 0.5 时停止培养;
- (3) 将培养液转入 50 mL 离心管中, 在冰上冷却 30 min, 4°C, 4000 r/min 离心 10 min;
- (4) 倒净上清培养液, 加入 10 mL 冰冷的新鲜配制的 0.1 mol/L CaCl₂ 溶液, 冰上轻轻悬浮细胞, 4°C, 4000 r/min 离心 10 min;
- (5) 弃上清, 加入 2 mL (每 50 mL 培养液最后用 2 mL 0.1 mol/L CaCl₂ 重悬) 冰冷的 0.1 mol/L CaCl₂ 溶液, 小心悬浮细胞, 冰上放置片刻后, 即制成感受态细胞;
- (6) 制备好的感受态细胞悬液加入终浓度为 15% 的无菌甘油, 混匀后每管分装 50 μL 于 1.5 mL 离心管中, 液氮速冻后置于 -80°C 冰箱保存。

◇ 质粒或连接产物转化大肠杆菌

- (1) 从 -80°C 冰箱中取出一管感受态细胞, 置于冰上融解;
- (2) 用移液器将要转化的质粒 DNA (1~2 μL) 或连接产物 (5~15 μL) 加入到感受态细胞中, 用移液器轻柔搅拌混匀 (不得吸打混匀), 冰浴 30 min;
- (3) 将上述离心管放入预加温至 42°C 的水浴中, 严格控制 90 s, 不要摇动;
- (4) 快速将离心管转移到冰浴中, 使细胞冷却 1~2 min;
- (5) 在超净工作台中, 每管加 800 μL 已预热的 SOC 培养基 (或 LB 培养基), 置于 37°C, 90 r/min 摇床, 孵育 45 min;
- (6) 7,000 r/min, 离心 1 min;
- (7) 在超净工作台中, 吸走 600 μL 上清, 剩余 200 μL 重悬所有已转化的感受态细胞, 并转移到含有相应抗生素的 LB 培养基上, 用灭菌玻璃珠涂布均匀;
- (8) 在超净工作台中, 倒出玻璃珠, 于超净工作台中打开平皿吹干液体;
- (9) 37°C 倒置培养, 12~16 h 后可出现单菌落。

◇ 菌落 PCR

- (1) 在每个 PCR 管里准备 10 μL ddH₂O;
- (2) 用牙签挑取单个克隆接种在 PCR 管里;

(3) 加入 10 μL PCR 母液混匀进行 PCR 反应，PCR 体系如下：

试剂	加样量 (μL)
10 \times Easy Taq Buffer	2.0
10 mmol/L dNTPs	0.3
10 $\mu\text{mol/L}$ Forward Primer	0.3
10 $\mu\text{mol/L}$ Reverse Primer	0.3
Easy Taq DNA Polymerase (5 U/ μL)	0.1
ddH ₂ O	up to 20

PCR 反应参数：

温度 ($^{\circ}\text{C}$)	时间	循环数 (cycles)
95	5 min	1
95	30 s	30
(T _m -5)	30 s	30
68	1 kb/min	30
68	10 min	1
25	5 min	1

◇ 大肠杆菌质粒提取

- (1) 挑取菌落 PCR 阳性的单菌落，接种于含有 5 mL 液体 LB 培养基的三角瓶中，37 $^{\circ}\text{C}$ ，200 r/min 振荡培养过夜（10~12 h）；
- (2) 移液器吸取 2.0 mL 上述菌液于 2.0 mL 离心管中，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下，8,000 r/min 离心 3 min，弃尽上清；
- (3) 将细菌沉淀重悬于 200 μL 预冷的溶液 I，涡旋仪涡旋混匀，冰上静置 5 min；
- (4) 加入 400 μL 新配制的溶液 II，盖紧管口，轻柔颠倒离心管数次，冰上静置 5 min；
- (5) 加 300 μL 预冷的溶液 III，轻柔颠倒离心管数次，冰上静置 5~10 min；
- (6) 4 $^{\circ}\text{C}$ ，10,000 r/min 离心 3 min，转移上清液至另一 2.0 mL 离心管中；

- (7) 加等体积的氯仿轻柔混匀，12,000 r/min 离心 5 min，再轻柔缓慢吸取上清液转移到 1.5 mL 离心管中；
- (8) 加入等体积的异丙醇，颠倒混匀，室温放置 10 min；
- (9) 4°C，12,000 r/min 离心 10 min，管底即可见白色的质粒沉淀；
- (10) 弃上清，用 1 mL 75% 的乙醇洗涤沉淀 2 次，低速离心后再用移液器吸走剩余乙醇，室温晾干 5~10 min；
- (11) 用 50 μ L ddH₂O（内含无 DNA 酶的胰 RNA 酶，终浓度为 20 μ g/mL）溶解质粒沉淀，37°C 保温 30 min 后，-20°C 保存备用。

◇ 终载体构建

- (1) 中间载体质粒测序；
- (2) 利用对应的限制性内切酶消化测序正确的中间载体，并根据分子量大小，回收目标 DNA 片段；
- (3) 将目标基因的 DNA 片段和载体片段，按照摩尔分子数目大约 3: 1 的比例进行 DNA 连接反应，体系如下：

试剂	加样量 (μ L)
载体	6.0
DNA 片段	2.0
10 \times T4 Buffer	1.0
T4 DNA 连接酶	1.0

17°C 过夜连接反应

- (4) 连接产物转化大肠杆菌感受态细胞，并进行菌落 PCR 鉴定；
- (5) 提取质粒进行酶切鉴定，-20°C 保存备用。

Gateway 系列载体构建

采用 gateway 方法构建的载体，将 PCR 扩增目的片段转至表达载体需要经过 BP 和 LR 重组反应，即 PCR 产物连接到中间载体创造入门载体，再由携带 attL 位点的入门克隆与携带 attR 位点的目标载体进行重组反应。

(1) BP 反应体系如下 (5 μL):

PMD18-T-gene	1.0 μL
pDONR vector	1.0 μL
BP clonase	1.0 μL
ddH ₂ O	2.0 μL

反应条件: 25°C 孵育 2 h

(2) LR 反应体系如下 (5 μL):

pDONR-gene	1.0 μL
Expression vector	1.0 μL
LR clonase	1.0 μL
ddH ₂ O	2.0 μL

反应条件: 25°C 孵育 2 h

(3) BP 和 LR 同时反应体系如下:

PCR product	1.0 μL
pDONR vector	1.0 μL
Expression vector	1.0 μL
BP clonase	0.25 μL
LR clonase	1.0 μL
ddH ₂ O	0.75 μL

反应条件: 25°C 孵育 12 h

取 2.5 μL LR 重组液转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 用含有 Spe (50 mg/L) 抗生素的平板培养基筛选单菌落, 并进行 PCR 鉴定阳性菌落。后续步骤同普通载体构建方法。

单位点 CRISPR 载体构建

◇ 靶位点选择

使用 **CRISPR-P** (<http://cbi.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR#>) 和 **CRISPR-PLANT** (<http://www.genome.arizona.edu/crispr/CRISPRsearch.html>) 两个在线软件预

测工具，选择合适靶位点。

✧ 接头引物设计（仅适用于 pRGEB32）

(1) 对于 PAM 上游第 20 个碱基是 A 的靶点，其接头引物设计如下

F: 5'-GGCA NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3'

R: 3'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN CAAA-5'

(2) 对于 PAM 上游第 20 个碱基不是 A 的靶点，其接头引物设计如下

F: 5'-GGCA (T/C) NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3'

R: 3'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN CAAA-5'

注：其中上述“NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN”代表靶位点序列

✧ 合成 sgDNA

将正向和反向靶引物用 ddH₂O 溶解成 10 μmol/L，各取 10 μL，PCR 仪中 94°C 反应 10 min，室温冷却后，加 80 μL ddH₂O 稀释（sgDNA）。

✧ 载体构建

(1) 载体酶切反应

pRGEB32 载体	3.0 μL
Buffer	1.0 μL
<i>Bsa</i> I	0.5-1 μL
dH ₂ O	6.0 μL

条件：37°C，4 h

(2) 连接反应

酶切后的 pRGEB32 载体	1 μL
T4 Buffer	2 μL
T4 DNA 连接酶	0.5 μL
sgDNA	2 μL

条件：25°C，30 min

(3) 转化大肠杆菌并进行菌落 PCR 鉴定，阳性克隆提取质粒测序。

具体实验操作同普通载体构建过程。

多位点 CRISPR 载体构建

以 MKK1 基因为例说明 CRISPR 载体构建

✧ 靶位点选择

使用 **CRISPR-P** (<http://cbi.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR#>) 和 **CRISPR-PLANT** (<http://www.genome.arizona.edu/crispr/CRISPRsearch.html>) 两个在线软件预测工具，选择合适靶位点。

为了提高突变效率，对一个目的基因设计 2 个靶点（尤其只有一个靶基因）。建议在 ORF 5' 区和功能结构域各设计 1 个靶点，使之任何 1 个靶点的突变都可以产生功能缺失，或 2 个靶点之间的序列被敲除。靶点序列 GC% 偏高可提高打靶效率，因此靶点最好含有 11-14 个 C/G

✧ 引物设计

根据谢卡斌的引物设计要求，每个引物只需要跟更换靶位点部分，其余的部分可以不用改变。

(1) 公用引物合成

L5AD5_F:

CGGGTCTCAGGCAGGATGGGCAGTCTGGGCAACAAAGCACCCAGT
GG

L3AD5_R:

TAGGTCTCCAAACGGATGAGCGACAGCAAACAAAAAAAAAAGCA
CCGACTCG

S5AD5_F: CGGGTCTCAGGCAGGATGGGCAGTCTGGGCA

S3AD5_R: TAGGTCTCCAAACGGATG AGCGACAGCAAAC

(2) 基因引物合成

基因靶序列 1 AGCAAGGT**AGGG**CTCTGGAA

反向 TTCCAGAG**CCCT**ACCTTGCT

gMKK1-1F:

AC GGTCTC A **AGGGCTCTGGAA** GTTTTAGAGCTAGAA

gMKK1-1R:

AC GGTCTC A **CCCTACCTTGCT** TGCACCAGCCGGGAA

基因靶序列 2 GGGCCTC**GTTATGCT**AGAAAT

反向 ATTCTAGCATA**ACGAGGCC**

gMKK1-2F:

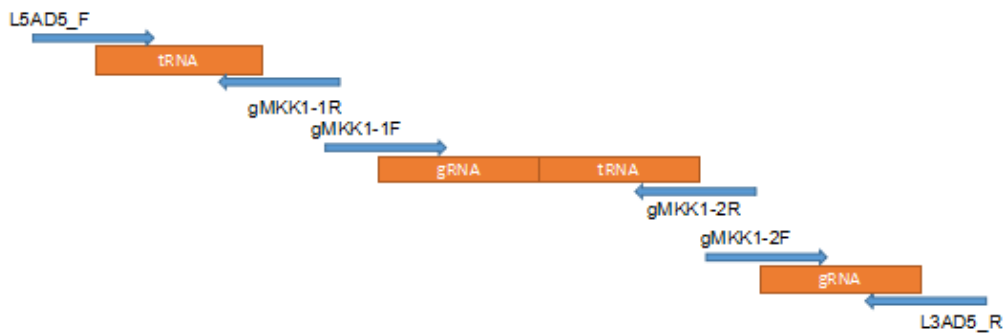
TA GGTCTC A **GTTATGCTAGAA** GTTTTAGAGCTAGAA

gMKK1-2R:

AT GGTCTC G **TAACGAGGCC** TGCACCAGCCGGGAA

◇ 载体构建

融合效果示意图:



- (1) 分别以上图所示三段橙色所示的核酸序列为模板 (pGTR), 利用相应的引物扩增这 3 段核酸序列, 并利用回收试剂盒分别回收这 3 段核酸序列;
- (2) Golden Gate 克隆法连接上述 3 段核酸序列, 反应体系如下:

核酸序列 1	1.5 μ L
核酸序列 2	1.5 μ L
核酸序列 3	2.0 μ L
T7DNA buffer	10.0 μ L
BSA	2.0 μ L
<i>Bsa</i> I	0.5 μ L
T7 连接酶	0.5 μ L
ddH ₂ O	2.0 μ L
Total	20.0 μ L

反应条件:

Step 1: 37°C 5 min

Step 2: 20°C 10 min

Step 1 to Step 2 35 次

Step 3: 20°C 60 min

- (3) 以步骤 (2) 的连接产物稀释 10 倍作为模板，以最端头的引物 (S5AD5_F 和 S3AD5_R) 扩增获得整合这 3 端核酸序列的融合 DNA 片段，反应体系如下：

模板	1.0 μL
S5AD5_F:	1.0 μL
S3AD5_R	1.0 μL
2 \times Taq master mix	10.0 μL
ddH ₂ O	7.0 μL

PCR 程序：

Step 1: 98°C 1 min

Step 2: 98°C 10 s

Step 3: 60°C 20 s

Step 4: 72°C 30 s

Step 2 to Step 4 30 次

Step 5: 72°C 5 min

- (4) 限制性内切酶反应

pRGEB32 载体酶切		步骤 (3) PCR 产物酶切	
pRGEB32 质粒	8 μL	片段	17 μL
<i>Bsa</i> I	1 μL	<i>Fok</i> I	1 μL
Smart Buffer	2 μL	Smart Buffer	2 μL
ddH ₂ O	9 μL	酶切条件: 37°C	4 h 或过夜
酶切条件: 37°C	过夜		

- (5) 连接反应

利用普通 T4 连接酶将上述酶切回收的 pRGEB32 载体和 PCR 产物连接

- (6) 连接产物转化大肠杆菌

方法步骤同普通载体构建过程中

(7) 菌落 PCR 检测

检测通用引物:

jc-F: AGTACCACCTCGGCTATCCACA

jc-R: GGACCTGCAGGCATGCACGCGCTAAAAACGGACTAGC

菌落 PCR 条件:

Step 1: 98°C 3 min

Step 2: 98°C 20 s

Step 3: 60°C 20 s

Step 4: 72°C 35 s

Step 2 to Step 4 30 次

Step 5: 72°C 5 min

(8) 测序: 挑选菌落 PCR 阳性的克隆, 提取质粒测序。

农杆菌操作

◇ 质粒 DNA 的农杆菌转化

- (1) 将感受态细胞置于冰上融化 (30 min 以上);
- (2) 加入 5 μ L 连接产物于感受态细胞中, 轻轻吸打混匀 2 次, 置于冰上 30 min;
- (3) 在液氮中速冻 1 min, 37°C 热激 1 min, 冰上放置 5 min;
- (4) 加入 750 μ L LB 混匀, 37°C, 150 r/min, 振荡培养 90 min;
- (5) 4,000 r/m, 离心 90 s;
- (6) 弃上清, 菌体沉淀加 100 μ L LB 培养基, 混匀后涂于含相应抗生素的平板。

◇ 农杆菌质粒提取与鉴定

- (1) 大量收集农杆菌于 1.5 mL 离心管中;
- (2) 加入 100 μ L solution I, 溶菌酶 20 μ L, 涡旋后, 37°C, 30 min;
- (3) 加入 200 μ L solution II, 快速颠倒离心管 5 次, 均匀震荡, 放置冰上 10 min;
- (4) 加入 150 μ L solution III, 反复颠倒数次, 使 solution III 在粘稠的细菌裂解物中分散均匀, 之后将管放置冰上 5 min;

- (5) 10000 r/min, 离心 3min, 将上清转入另一离心管中;
- (6) 加入等体积的酚: 氯仿, 震荡, 12,000 r/min 离心 5 min, 取上清液于另一离心管中;
- (7) 加等体积的氯仿轻柔混匀, 12,000 r/min 离心 5 min, 再轻柔缓慢吸取上清液转移到 1.5 mL 离心管中;
- (8) 加入等体积的异丙醇, 颠倒混匀, 室温放置 10 min;
- (9) 4°C, 12,000 r/min 离心 10 min, 管底即可见白色的质粒沉淀;
- (10) 弃上清, 用 1 mL 75% 的乙醇洗涤沉淀 2 次, 低速离心后再用移液器吸走剩余乙醇, 室温晾干 5~10 min;
- (11) 用 50 μ L ddH₂O (内含无 DNA 酶的胰 RNA 酶, 终浓度为 20 μ g/mL) 溶解质粒沉淀;
- (12) 质粒转化大肠杆菌, 并提取质粒进行 PCR 与酶切检测。

转基因操作

水稻转基因

◇ 愈伤组织诱导

- (1) 选取饱满、无霉斑的成熟水稻种子去壳，先用无菌水冲洗 3 遍，然后用 70% 的乙醇处理 1 min，不时摇动；
- (2) 用无菌水冲洗 3 遍，每次 30 s，不时摇动；
- (3) 用 0.1% 升汞溶液消毒 12 min，不时摇动；

上述步骤可以在超净工作台外面操作，在第（3）步快结束时，用酒精棉球将装有消毒种子的小三角瓶擦拭干净后拿到超净工作台上。

- (4) 用无菌水冲洗 5 遍以上，每次 30 s，不时摇动；
- (5) 将种子放在灭菌滤纸上吸干水分，然后用无菌镊子夹到诱导培养基上；
- (6) 28℃，暗培养 4 周以上。

准备工作：

① 超净工作台的消毒：

清除台面 → 75%乙醇喷雾超净工作台 → 75%的酒精棉球擦拭超净工作台面 → 将接种所用物品用酒精棉球擦拭干净后放在台面上（酒精灯，打火机，已灭菌镊子，无菌水 1 瓶，已灭菌的大玻璃杯 1 个（盛废液），已灭菌的小玻璃杯 1 个（盛 95%酒精，用于消毒镊子），盛诱导培养基的平皿若干，铺有灭菌滤纸的平皿一个） → 打开紫外灯杀菌 20-30 min，然后打开鼓风机和工作电源，关闭紫外灯，5 min 后接种；

② 接种人员首先用洗洁精洗净双手后，用酒精棉球擦拭双手，特别是指甲处。如有可能，将胳膊做同样消毒处理。

注意事项：

- ① 在接种过程中要经常灼烧镊子，防止交叉污染；
- ② 尽量在酒精灯下风向的一小块无菌空间操作，尽量避免在接种材料的上层空间活动；
- ③ 接种员双手不能离开工作台，不能说话、走动和咳嗽等；

- ④ 培养瓶上贴上标签，标明接种材料和日期；
- ⑤ 无菌水需准备 2 瓶，一瓶在超净工作台外面使用，另一瓶在超净工作台里面使用；
- ⑥ 若接种材料出现污染，及时转接培养基。

附注：2 d 后水稻种子开始萌发，7-10 d 即从盾片处产生小块愈伤组织，2 周左右愈伤进一步膨大，此时愈伤组织质地较硬，成块状，淡黄色。

◇ 愈伤组织继代培养

挑选颜色鲜亮、紧实且干燥的胚性愈伤（即散落到培养基上的愈伤，不要选从种子上发出来的愈伤），放于继代培养基上暗培养 2 周，温度 28℃。

◇ 预培养

挑选紧实且干燥的胚性愈伤，放于预培养基上暗培养 4-14 d（不超过 2 周），温度 28℃。

◇ 农杆菌侵染

- (1) 在低温（4℃或-80℃）保存的农杆菌，划线培养活化一次，再预培养 2 天。
然后转移至装有悬浮培养基的离心管里，涡旋振荡重悬农杆菌，调节农杆菌的悬浮液至 OD₆₀₀ 大约为 0.8-1.0；
- (2) 挑选颜色鲜亮、紧实且干燥的胚性愈伤转移至灭菌好的三角瓶内；
- (3) 加入农杆菌悬浮液，浸泡愈伤 30 min；
- (4) 转移愈伤至灭菌好的滤纸上，超净工作台上吹干（1 h 以上）；
- (5) 然后将愈伤放置在已铺有一层滤纸的共培养基上 20℃培养 3 d。

准备工作：酒精灯，打火机，灭菌镊子，共培养基，悬浮培养基，灭菌三角瓶一个，铺有灭菌滤纸的平皿一个，已灭菌的小玻璃杯 1 个（盛 95%酒精，用于消毒镊子）

◇ 选择培养

- (1) 将共培养的愈伤转移至灭菌好的三角瓶内；
- (2) 用灭菌的蒸馏水充分洗涤愈伤；
- (3) 将愈伤浸泡在含 400 mg/L 羧苄青霉素的灭菌水中 30 min，不时摇动；
- (4) 转移愈伤至灭菌好的滤纸上吸干水分，并在超净工作台中晾干（约 3h）；
- (5) 转移愈伤至含有 50 mg/L 选择培养基上选择培养 2 次，每次 2 周（第一次羧苄青霉素筛选浓度为 400 mg/L，第二次为 250 mg/L）。

准备工作：酒精灯，打火机，灭菌镊子，灭菌水 1 瓶，选择培养基，灭菌三角瓶 2 个（一个用来装愈伤，另一个用来配含 400 ppm 羧苄青霉素的灭菌水），铺有灭菌滤纸的平皿一个，已灭菌的小玻璃杯 1 个（盛 95%酒精，用于消毒镊子），已灭菌的大玻璃杯 1 个（盛废液）

◇ 分化培养

将抗性愈伤转移至分化培养基上，光照下培养，温度 28 °C。

◇ 生根培养

剪掉分化时产生的根，然后将其转移至生根培养基中，光培养 2 周以上，温度 26 °C（转移至生根培养基上，1-2 d 就能长出新根）。

准备工作：酒精灯，打火机，灭菌镊子，灭菌剪刀，生根培养基，已灭菌的小玻璃杯 1 个（盛 95%酒精，用于消毒镊子）

◇ 移栽

待苗高 10 cm 左右，根系发生较好，打开瓶盖，向瓶内注入无菌水，炼苗 2 d 后，洗掉根上的残留培养基（注意不要伤根），移栽。在最初的几天，蒙上保鲜膜，避免强光照射，保持水分湿润。

拟南芥转基因

- (1) 活化：取 10 μL 保存菌种或划线长出的单克隆菌斑接种到 5 mL 液体 LB 中（加入对应载体抗生素 + 20 mg/mL Rif + 10 mg/mL 庆大霉素，庆大霉素也可不加），28 $^{\circ}\text{C}$ ，200 r/min，振荡培养至 OD_{600} 值到达 2.0 左右；
- (2) 扩大培养：按 1: 100 的比例接种扩大培养（如取 1 中 500 μL 菌液接种到 50 mL 培养基中），28 $^{\circ}\text{C}$ ，200 r/min，振荡培养至 OD_{600} 值在 1.5 ~ 2.0 之间；
- (3) 室温收集菌液，4000 g 离心 10 min；
- (4) 重悬菌液：用含 5% (w/v) 蔗糖的 1/2 MS 液体培养基轻轻悬浮沉淀的菌体， OD_{600} 值控制在 0.8 ~ 0.9 之间；
- (5) 浸染前加入 0.02% (v/v) 的 Silwet L-77（不可多加，有毒害作用），轻摇匀，菌液倒入平皿或方盒中进行花序浸染；
- (6) 花序（事先剪去已长出的角果），浸没在菌液中 12 ~ 14 s，期间轻轻抖动花序，拿出花序后，将花序轻轻抖动一下，避免粘了大量菌液，保持花序湿润且无菌液下滴即可；
- (7) 在钵子内插上竹签，罩上黑塑料袋。1-2 d 后揭膜。收获的种子为 T1 代。

洋葱表皮细胞瞬时转化

✧ 实验材料准备

选取新鲜、生长状况良好的洋葱，在超净工作台上除去外面的 1-2 层鳞片，用无菌解剖刀十字形切开洋葱球茎，取球茎内部较新鲜肥厚的鳞片（第 4-7 层最为理想），在内表皮（凹面）用刀片划出面积约 $2\text{cm} \times 2\text{cm}$ 的小方块，用无菌镊子将小方块撕下，贴近叶肉的一面朝下，平铺于含有 MS 培养基的培养皿内，28 $^{\circ}\text{C}$ 弱光下预培养 4 h，然后利用基因枪法进行目的基因的转化。

✧ 金粉准备

- (1) 称取 60 mg 金粉放入 1.5 mL 离心管，加入 1 mL 无水乙醇，涡旋振荡 2 min；
- (2) 冰上放置 5 min 后，10,000 r/min 离心 1 min，去上清；
- (3) 按步骤 1，2 重复清洗金粉 2 次；

- (4) 加入 1 mL 无菌水，涡旋振荡 2 min，冰上放置 5 min 后，10,000 r/min 离心 1 min，去上清；
- (5) 重复步骤 4 两次；
- (6) 加入 1 mL 无菌水，在涡旋振荡条件下，按 50 μ L 每份分装到 1.5 mL 离心管备用。

✧ 质粒 DNA 包埋金粉

- (1) 取 50 μ L 已分装好的金粉悬浮液，在涡旋振荡条件下依次加入 5 μ L 质粒 DNA (1 μ g/ μ L)，50 μ L 2.5 mol/L CaCl_2 ，20 μ L 0.1 mol/L 亚精胺；
- (2) 涡旋振荡 3 min，室温下，10,000 r/min 离心 10 sec，尽可能弃去上清；
- (3) 加入 50 μ L 无水乙醇，可进行 4 次基因枪轰击。

✧ 基因枪轰击操作

射击参数：轰击微粒运行距离 9 cm，压力 1350 psi，真空度 20 mmHg。将轰击结束后的材料，继续在 28°C 弱光下培养 8 h，然后使用激光共聚焦显微镜在 488 nm 波长激发下观察 EGFP 基因的表达。

分子标记

◇ PCR 体系和扩增程序

PCR 扩增采用 20 μL 反应体系:

10 \times buffer (Mg ²⁺ plus)	2 μL
dNTP (2.5 mmol/L)	1 μL
forward primer (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.3 μL
reverse primer (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.3 μL
DNA (100 nmol/L)	1 μL
EasyTaq DNA Polymerase (2.5 U/ μL)	0.2 μL
ddH ₂ O	15 μL

PCR 反应程序:

95°C, 5 min; 95°C, 30 s; 64°C, 30 s; 72°C, 30 s; 28-33 cycle; 72°C, 10 min。

◇ 聚丙烯酰胺凝胶制备

- (1) 长玻璃使用前要在 3% 氢氧化钠溶液中浸泡, 用洗洁精洗干净后晾干备用;
- (2) 用 95% 乙醇分别擦拭长、短玻璃后, 晾至乙醇挥发;
- (3) 乙醇挥发后, 先在滤纸上滴几滴酒精, 分别在短玻璃 (背板) 上涂 5% 硅化剂 5-10 滴, 长玻璃上涂反硅化剂, 将 8 μL 反硅化剂加入 1.5 mL 离心管中, 再加入 95% 乙醇 1 mL, 混匀后使用, 涂抹均匀, 再用酒精沾湿滤纸涂抹一次, 晾 5-10 min;
- (4) 将封条置于两玻璃间, 用夹子固定好, 调整水平支架, 使灌胶口稍高一点;
- (5) 在烧杯中倒入 55 mL 6% PAGE, 再分别加入 400 μL 10% AP 及 40 μL TEMED, 快速搅拌均匀;
- (6) 将 PAGE 胶灌入两玻璃间, 适当轻敲玻璃以防产生气泡。然后将干净的梳子背部插入两玻璃间, 用夹子固定好。静置 45-60 min。

◇ 电泳

- (1) 电泳前将玻璃板上的碎胶用自来水冲洗干净, 小心取下梳子后架上电泳槽

进行预电泳 30 min，条件：电压 2000 V，电流 100 mA，功率 90 W；

- (2) 预电泳结束，用枪吸打点样口的悬浮物后再点样；
- (3) 向 PCR 产物中加入相应体积的上样缓冲液，取 3 μ L 点样；
- (4) 电泳条件：电压 500 V，电流 100 mA，功率 90 W。

◇ 显影

- (1) 用蒸馏水漂洗 1 min；
- (2) 银染 10-15 min；
- (3) 取出玻璃，轻轻甩脱附在凝胶表面的染色液，用单蒸水快速漂洗 10 s；
- (4) 显影液中显影（冷的显影液显影速度略慢些，便于控制显影效果，因此夏天显影液一般要预冷，冬天气温低可不需预冷）至满意效果；
- (5) 显影完毕，取出玻璃，在专用凉玻璃架上沥干水后方可在灯箱上读带。

蛋白、生化分析

蛋白质原核表达

◇ 蛋白诱导表达可溶性鉴定

- (1) 从冻存的菌液中取 10 μL ，接种于 5 mL 的 LB 培养基中，加入 5 μL 氨苄青霉素（100 mg/mL），过夜活化菌株；
- (2) 按照 1: 50 的比例，从活化的菌株中，取 1 mL 菌液接种于 50 mL LB 培养基中，加入 50 μL 氨苄青霉素（100 mg/mL），扩大培养 3 h；
- (3) 扩大培养后的菌液取出 10 mL，不加 IPTG，作为空白对照；剩余的 40 mL 菌液中加入 40 μL IPTG（0.2 mol/L），37 $^{\circ}\text{C}$ ，200 r/min，培养 3 h，诱导蛋白表达；
- (4) 用 50 mL 离心管收集菌体，8000 r/min，离心 3 min；
- (5) 去上清，加入 40 mL 左右的 dH₂O 洗菌体 1 遍，12000 r/min，离心 2 min；
- (6) 去上清，根据菌体的浓度，加入适量的 PBS buffer 悬浮菌体；
- (7) 超声波破碎菌体，功率为 200 W，超声波工作 3 s，停止 8 s，反复 70 次；
- (8) 4 $^{\circ}\text{C}$ ，12000 r/min，离心 3 min，分离上清和沉淀；
- (9) 在沉淀中加入 250 μL 1 \times SDS loading buffer，200 μL 上清中加入 50 μL 5 \times SDS loading buffer，在沸水中加热 5 min；
- (10) 样品冷却到室温，12000 r/min，离心 2 min；
- (11) 取离心后的上清 40 μL 点样并 SDS-PAGE 检测。

根据 SDS-PAGE 结果，判断目的蛋白是以包涵体还是以可溶性蛋白的形式产生，如果蛋白形成包涵体，则应改变诱导条件，如果蛋白在上清中表达，则继续进行下一步实验。

◇ 蛋白纯化

- (1) 大量诱导目的蛋白的表达，超声波破碎细胞（加入 1 mmol/L PMSF），4 $^{\circ}\text{C}$ ，12000 r/min，离心 20 min，收集上清，即为需要纯化的样品；
- (2) GST 纯化柱的柱床保存在 20% 的乙醇中，使用之前，先用吸管将柱床轻轻

- 加入到柱子中，打开柱子流出乙醇，使柱床沉积下来；
- (3) 加入 10 mL PBS buffer，洗柱床 3 遍，使柱床重新平衡；
 - (4) 将准备好的样品加入柱中，每次加入 5-10 mL 样品，使样品与 GST 结合；
 - (5) 用 10 mL PBS buffer 洗脱与 GST 非特异性结合的杂蛋白，重复 3 遍，直至洗脱出来的液体 OD₂₈₀ 读数小于 5.0；
 - (6) 加入 5 mL 10 mmol/L 还原型谷胱甘肽（用 Tris HCl 配制，pH 8.0）洗脱目的蛋白。用 1.5 mL 离心管收集样品，每管收集 0.5 mL 样，共收集 6-8 管；
 - (7) 用 PBS Buffer 洗柱子 3 遍，继续下一次样品纯化；
 - (8) 分光光度计测收集的所有样品的 OD₂₈₀ 值，将浓度大于 200 μg/mL 的样品混合，冻于-20℃冰箱中；
 - (9) SDS-PAGE 检测纯化样品的纯度。

抗体制备与纯化

✧ 抗体制备

- (1) 利用在线软件（<http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>）预测高变区抗原表位，选择融合表达蛋白区段；
- (2) 根据选择的抗原表位区的 cDNA 序列，设计相应的上下游引物，构建原核表达载体；
- (3) 按照原核表达步骤表达含有抗原表位的目标蛋白区段；
- (4) 当纯化的蛋白（即抗原）总量达到 5 mg 时，将所有蛋白冷冻抽干，送于南京金斯瑞公司制备抗体。

✧ 抗体纯化

- (1) 装柱：用 1 mL Protein A-Agarose 装柱，柱床高度约 1.5 mL，用 5 mL 水洗脱，去除 20% 乙醇，然后用 10 mL 1 × TBS 平衡柱子；
- (2) 稀释血清：取 4 mL 兔血清，4℃，5000 r/min 离心 10 min，取上清，加入 4 mL 2 × TBS；
- (3) 上柱吸附：8 mL 稀释后的血清上柱，将流速尽量调小，约 1 mL/min；
- (4) 洗去杂蛋白：用约 20 mL 1 × TBS 洗脱杂蛋白，直到流出液蛋白浓度小于 80

μg/mL;

- (5) 洗脱 IgG: 加入 3 mL 洗脱缓冲液 (洗脱开始后, 当柱顶的洗脱液快要流尽时, 再补加 3 mL 洗脱缓冲液), 先排放 10 滴洗脱液, 关闭开关, 静置 3-5 min, 打开开关, 缓慢洗脱 (将流速调到很低, 每管收集 10 滴, 约 0.5 mL);
- (6) 中和: 每当收集到 1 管后, 立即加入 100 μL 中和缓冲液, 混匀;
- (7) IgG 浓度测定: 分别取各管收集液 10 μL, 稀释 10 倍, 测定蛋白浓度;
- (8) 分装和储存: 选取浓度较大的 7-8 管收集液, 混合, 准确测定 IgG 浓度, 做好标记, 每管分装 500 μL, 4°C 保存;
- (9) IgG 纯度测定: SDS-PAGE, 每个泳道点样量 5-10 μg 蛋白, A. 全血清, B. 洗脱的杂蛋白, C. 洗脱的 IgG, D. 蛋白质分子量 marker;
- (10) Agarose 回收: 先后用 10 mL 水, 10 mL 20% 乙醇洗脱柱子, 回收 Agarose, 4°C 保存;
- (11) 柱子再生 (如果有必要):
 - A. 20% 乙醇, 5 个柱床体积, 70% 乙醇, 10 个柱床体积
(柱子在多次纯化同一种抗体后使用)
 - B. pH 1.9 的再生液 (50 mmol/L Glycine-HCl, pH 1.9), 10 个柱床体积
(柱子在纯化不同种类的抗体时使用)

Brandford 法测定蛋白浓度

- (1) 配制标准曲线: 配制 1 mg/mL 的 BSA 母液, 梯度稀释至终浓度为 0, 20, 40, 60, 80 μg/mL;
- (2) 取各浓度的 BSA 1 mL, 加入 3 mL Brandford 显色液, 室温反应 10 min;
- (3) 在波长 595 nm 处, 测分光光度计读数, 记录每个浓度对应的 OD 值;
- (4) 在 Excel 表中, 计算标准曲线的公式;
- (5) 取待测蛋白溶液 1 mL, 加入 3 mL Brandford 显色液, 室温反应 10 min, 在波长 595 nm 处, 测分光光度计读数。根据标准曲线计算蛋白浓度。

膜蛋白提取与分离

- (1) 取材：取研究对应时期的植物组织于-80°C保存；
- (2) 组织破碎：在预冷的研钵中加入液氮将植物组织研磨至粉末状，加入含有 3 种蛋白酶抑制剂（终浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ Leupeptin, 1 $\mu\text{mol/L}$ Pepstatin A, 1 mmol/L PMSF）的 50 mmol/L MOPS/NaOH buffer (pH 7.5)，研磨 5 min，分装到 15 mL 离心管；
- (3) 4°C, 2000 g 离心 10 min（转速缓慢增加）；
- (4) 上清抽滤（双层纱布）到超速离心管中，4°C, 45000 r/min，超速离心（BECKMAN, ptima LE-80K, 转头型号 Ti 70）30 min；
- (5) 用加有上述 3 种蛋白酶抑制剂的 50 mmol/L MOPS/NaOH buffer (pH 7.5) 悬浮沉淀，匀浆器打散沉淀，加终浓度为 0.05% Digitonin, 4°C, 在联合混合器中翻转，溶解膜蛋白 30 min；
- (6) 4°C, 5000 g 离心 15 min，上清即为溶解的膜蛋白，调整膜蛋白浓度。

免疫共沉淀（CO-IP）

- (1) protein A-Agarose 的预处理：每个反应取 40 μL 50%的 Protein A-Agarose 溶液置于冰上，自然沉降（注意不要震荡）轻微离心，去掉上清，加等体积的 50 mmol/L Mops/NaOH buffer (pH 7.5)，用剪过的黄枪头混匀，先自然沉降，然后 1000 g 离心 1 min，轻轻吸取上清，重复 3 次，最后加 50 mmol/L Mops/NaOH buffer (pH 7.5)，使总体积达 40 μL ；
- (2) 取 500 μL 蛋白于一离心管中，加入 5 μL 抗体（1: 100）；4°C，静音混合器中翻转 1 h 后，再加 40 μL 的 Protein A-Agarose 溶液，4°C 静音混合器翻转 1 h；
- (3) 将离心管置于冰上 10 min，使自然沉降，2000 g 离心 1 min；
- (4) 用 50 mmol/L Mops Mops/NaOH buffer (pH 7.5) 洗涤沉淀 3 次；
- (5) 离心，去上清，加入 50 μL SDS-loading buffer（含 5% β -巯基乙醇）。70°C 水浴 5 min。12000 r/min 离心 2 min，上清即为免疫共沉淀分离的蛋白。

SDS-PAGE

(1) 制作分离胶（两块配方）

试剂	凝胶浓度 (15%)	凝胶浓度 (12%)	凝胶浓度 (8%)
ddH ₂ O	3.4 mL	4.9 mL	6.9 mL
30% Acr-Bis (29: 1)	7.5 mL	6.0 mL	4.0 mL
1.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.8)	3.8 mL	3.8 mL	3.8 mL
10% SDS	150 μL	150 μL	150 μL
10% 过硫酸铵	150 μL	150 μL	150 μL
TEMED	20 μL	20 μL	20 μL
总体积	15 mL	15 mL	15 mL

按表中所列顺序从上到下加试剂，加完TEMED后，轻轻摇匀液体，一块胶加7 mL溶液。然后，用1 mL ddH₂O封住分离胶液面，37°C 凝固15 min，至分离胶与水之间出现一条清亮的分界线，倾倒水层，用滤纸条将残余的水吸干；

(2) 制作浓缩胶（两块配方）

试剂	凝胶浓度 (5%)
ddH ₂ O	3.4 mL
30% Acr-Bis (29: 1)	0.85 mL
1 mol/L Tris-HCl (pH 6.8)	0.63 mL
10% SDS	50 μL
10% 过硫酸铵	50 μL
TEMED	20 μL
总体积	5 mL

胶配好后混匀，灌胶 2 mL，立即插梳子，插梳子时根据点样量和浓缩胶长短调整梳子插入的深度，于 37°C凝固 15 min；

(3) 胶凝固好后，将胶放入电泳槽中，加入 1 × Tris-Gly 电泳缓冲液没过点样孔，取出梳子，胶外侧缓冲液界面应完全没过电极；

- (4) 点样后,先用 50 V 电压电泳 30 min,待蛋白进入分离胶,70 V 电压电泳 3 h;
- (5) 当溴酚蓝电泳至胶槽底部时,停止电泳,剥胶,切除浓缩胶,将分离胶加入考马斯亮蓝染色液,40 r/min,染色 3 h 以上;
- (6) 将凝胶用蒸馏水冲洗 1 遍,倒入考马斯亮蓝脱色液,40 r/min 脱色至背景透明,每 60 min 更换一次脱色液。

Western blot

- (1) SDS-PAGE;
- (2) 电泳结束后,取出 PAGE 胶,切除多余的部分(溴酚蓝条带和空白胶),测量并记录胶的长和宽;
- (3) 裁出 6 张比蛋白胶稍大一些的滤纸片和 1 张硝酸纤维素膜(或 PVDF 膜);
- (4) 将胶、膜、滤纸和海绵放在盛有转膜缓冲液的培养皿中浸泡 5 min。在胶夹板的黑板面上依次铺上海绵、3 层滤纸、硝酸纤维素膜(或 PVDF 膜)、蛋白胶和 3 层滤纸。每次铺完 3 层滤纸后要赶气泡,尽量保证滤纸和硝酸纤维素膜之间对齐;
- (5) 将胶板夹放入转移电泳槽(注意:膜朝正极放置,即黑色一面朝正极)。倒入转膜缓冲液,一定要没过胶。75 V,60 mA,4°C 冰箱里电泳 10 h;
- (6) 关闭电源,用小镊子夹着膜的一角取出膜,放入用单蒸水洗净的平皿中;
- (7) 加入 15 mL 封闭液,膜刚好被没过即可,室温平缓摇动 1 h;
- (8) 回收封闭液,用 TTBS 洗膜 3 次,每次 3 min;
- (9) 加入一抗溶液,室温平缓摇动 1 h;
- (10) 回收一抗溶液,用 TTBS 洗膜 3 次,每次 5 min;
- (11) 加入二抗溶液,室温平缓摇动 1 h;
- (12) 回收二抗溶液,用 TTBS 洗膜 3 次,每次 5 min,最后再用 TBS 洗膜 5 min;
- (13) 加入 ECL 显色液,室温平缓摇动 3 min,将膜用镊子取出,放在一次性手套上晾干;扫描图片,写好标记,将膜放入自封袋中保存。

纤维素体外合成

- (1) 取溶解的膜蛋白 380 μL ，分别加入如下试剂：

试剂	存储浓度	工作浓度	每管反应加入量
UDP-glucose	100 mmol/L	2 mmol/L	10 μL
Cellobiose	100 mmol/L	10 mmol/L	50 μL
MgCl ₂	100 mmol/L	10 mmol/L	50 μL
CaCl ₂	200 mmol/L	2 mmol/L	5 μL
C ¹⁴ -UDPG	0.025 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$	--	2 μL

其中 UDP-glucose 和 C¹⁴-UDP-glucose (Perkin NEC403050UC, 中国同位素公司) 的摩尔比为 7550。

- (2) 先在 25°C 摇床反应 2 h，再转入 37°C 摇床反应 2 h；
- (3) 将反应的离心管置于沸水浴中 10 min 以终止反应，自然冷却；
- (4) 将反应的离心管加无水乙醇，使乙醇的终浓度为 70%，加盖，涡旋混匀，静置 5 min，室温下 14000 r/min 离心 10 min，弃上清（留 150 μL 液体）。沉淀加 70% 乙醇，涡旋混匀，静置 5 min，室温下 14000 g 离心 10 min，弃上清，重复 5-6 次，直至取 200 μL 上清在液体闪烁计数器 (Perkin 1450-024) 测 C¹⁴ 放射性强度小于 60 cpm，将上清尽量去除干净；
- (5) 沉淀加 700 μL 氯仿：甲醇 (1: 1)，涡旋混匀，40°C，150 r/min，反应 1 h。3000 g 离心 5 min，弃上清，沉淀再加 700 μL 甲醇，涡旋混匀，3000 g 离心 5 min，弃上清，沉淀再加 700 μL 丙酮，涡旋混匀，3000 g 离心 5 min，弃上清，风干；
- (6) 沉淀加 500 μL 0.1 mol/L 乙酸钠缓冲液 (pH 4.5)，加 2 μL 20 U/mL Endo- β -1,3-glucanase (Megazyme) 和 0.5 μL 100 U/mL Exo- β -1,3-glucanase (Megazyme) 充分混匀，置于 37°C 摇床，150 r/min 反应 24 h。沸水浴灭活 10 min，自然冷却。蒸馏水洗涤沉淀，涡旋混匀，静置 5 min，室温下 14000 r/min 离心 10 min，收集上清，沉淀留 150 μL 液体，重复数次，直至取 200 μL 上清测 C¹⁴ 放射性强度小于 60 cpm，将所有上清收集到一个离心管中；
- (7) 沉淀加 800 μL 0.1 mol/L 乙酸钠/乙酸缓冲液 (pH 4.8)，加 200 μL 0.32 mg/mL

纤维素复合酶（和氏璧生物技术有限公司），充分混匀，置于 37°C 摇床，150 r/min 反应 24 h。沸水浴灭活 10 min，自然冷却。蒸馏水洗涤沉淀，涡旋混匀，静置 5 min，室温下 14000 r/min 离心 10 min，收集上清，沉淀留 150 μ L 液体，重复数次，直至取 200 μ L 上清测 C^{14} 放射性强度小于 60 cpm，将所有上清收集到一个离心管中；

- (8) 沉淀保留 150 μ L 液体，加 800 μ L 闪烁液，涡旋混匀，液体闪烁计数器上读取 C^{14} 放射性强度，为纤维素复合酶所不酶解的 β -1,4-glucan 产物读数；
- (9) 收集 6, 7 两步的所有水洗上清。98°C 烘箱中烘至溶液体积为 1 mL，加 2 倍体积的闪烁液，涡旋混匀，液体闪烁计数器上读取 C^{14} 放射性强度，分别 β -1,3-glucanase 酶解和纤维素复合酶酶解的产物读数。

纤维素酶活性测定

◇ 酶活性测定步骤

- (1) 取 0.1 g 鲜样，用液氮研磨成粉；
- (2) 加 200 μ L NaAC Buffer（100 mmol/L, pH 5.5）充分混匀；
- (3) 4°C，13000 r/min（Eppendorf Centrifuge 5417 R）离心 10 min；
- (4) 收集上清并重复一次。上清即为粗酶液，置于冰上；
- (5) 将粗酶液加入黑色平底的 96 孔板（Greiner Microlon），每孔加 50 μ L；对照组每孔加入 50 μ L NaAC Buffer（100 mmol/L, pH 5.5）；
- (6) 加入 50 μ L 0.5 mmol/L 4-甲基伞形酮- β -纤维二糖（Sigma），混匀后 55°C 反应 30 min；
- (7) 每孔中加入 30 μ L 反应终止液（0.2 mol/L Na_2CO_3 ）；
- (8) 使用酶标仪（TECAN Infinite M200）测定释放的 4-甲基伞形酮的荧光强度，激发波长 365 nm，接收波长 480 nm。

◇ 产物标准曲线制作

标准曲线制作：

MU 标样浓度：0.5 mmol/L

MU 加入体积 (μ L): 0 20 40 60 80 100

NaAc buffer 体积 (μL): 100 80 60 40 20 0

◇ 蛋白浓度测定

样品稀释 10 倍后取 20 μL 于 96 孔板，加入 Bradford，用酶标仪测定 595 nm 处的吸光度。

蛋白浓度标准曲线：

BSA 标样浓度 ($\mu\text{g/mL}$): 0 20 40 60 80 100

BSA 加入体积 (μL): 20 20 20 20 20 20

Bradford 体积 (μL): 200 200 200 200 200 200

β -葡萄糖苷水解酶活性测定

- (1) 取鲜样用液氮研磨成粉末，加入 800 μL 的 pH 5.0 柠檬酸三钠缓冲液，1,2000 r/min，离心 10 min，收集上清；
 - (2) 再重复离心一次，收集上清；
 - (3) 在 15 mL 离心管中加入反应物（1 mL 的反应体系）：100 μL 的酶液、400 μL 柠檬酸三钠缓冲液和 500 μL 8 mmol/L 对硝基苯基 β -D 葡萄糖（*p*-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, *p*NPG）；用煮沸后的酶液作为空白对照；
 - (4) 在 50 $^{\circ}\text{C}$ 100 r/min 条件下，反应 30 min；
 - (5) 每管加入 500 μL 1 mol/L Na_2CO_3 ，终止反应；
 - (6) 3000 g 离心 10 min，收集上清。通过分光光度计测定波长 410 nm 吸光度。
- 注：标准曲线对硝基苯酚采用 5 个浓度梯度：0 mmol/L、0.04 mmol/L、0.08 mmol/L、0.16 mmol/L 和 0.24 mmol/L。

酵母双杂交

◇ 酵母感受态的制备

- (1) 将原始菌株 AH109/Y187 在 YPDA 平板上划线培养，挑取新鲜单菌落，在 20 mL YPDA 培养基中，30 $^{\circ}\text{C}$ ，200 r/min，培养至 OD_{600} 为 1-2（16-18 h）；

- (2) 接种 2-5 mL 活化的菌至 100 mL YPDA (OD_{600} 为 0.15-0.3) 液体培养基中扩大培养, 30 °C, 200 r/min, OD_{600} 为 0.4-0.6 (3 h), 室温, 1000 r/min, 离心 5 min, 收集菌体;
- (3) 将菌体重悬于 30 mL 灭菌 ddH₂O or 1 × TE 中, 室温, 1000 r/min, 离心 5 min; 并重复一次; 将菌体重悬于 3 mL 1.1 × TE/LiAc (1.1 mL of 10 × TE with 1.1 mL of 1 mol/L LiAc (10×) Bring the total volume to 10 mL using sterile, deionized H₂O) 溶液后, 分装到 2 个 1.5 mL 离心管中, 室温, 12000 r/min, 离心 15 sec;
- (4) 弃上清, 将菌体重悬于 600 μL 1.1 × TE/LiAc 溶液中。

◇ 酵母转化 (一)

- (1) 在 2.0 mL 灭菌离心管中加入:

试剂	加样量 (μL)
ds DNA (25 ng/μL)	5
pGADT7-Rec (500 ng/μL)	0.5
Herring tests carrier DNA (10 μg/μL)	10
AH109/Y187 感受态	100

使用前, 取 50 μL carrier DNA 于新的离心管中, 100 °C 加热 5 min, 立即冰浴 5 min, 重复 1 次, 然后加入到上述体系中, 轻轻震荡混匀;

- (2) 加入 500 μL PEG/LiAc, 混匀后置于 30 °C 培养 30 min, 每 10 min 混匀 1 次 (轻微);
- (3) 加入 20 μL DMSO, 混匀, 42 °C 水浴 15 min, 每 5 min 混匀 1 次 (轻微);
- (4) 室温, 7000 r/min, 离心 1 min, 菌体重悬于 1 mL YPDA 培养基中, 30 °C, 120 r/min, 培养 90 min;
- (5) 室温, 7000 r/min, 离心 1 min, 菌体重悬于 1 mL 1 × TE (0.9% NaCl) 溶液中;
- (6) 将菌液涂布在 SD/-Trp or SD/-Leu 平板上, 每个 100 mm 的平板涂菌液 200 μL (按照 1/10、1/100、1/1000 的比例稀释菌液, 检测转化效率);
- (7) 将平板倒置于 30 °C 培养箱中, 培养 3 d, 长出单菌落。

◇ 酵母转化（二）

(1) 在 2.0 mL 灭菌离心管中加入：

试剂	加样量 (μL)
ds DNA (25 ng/ μL)	0
载体 pGADT7-Rec (500 ng/ μL)	20
Herring tests carrier DNA (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	10
AH109/Y187 感受态	200

使用前，取 50 μL carrier DNA 于新的离心管中，100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min，立即冰浴 5 min，重复 1 次，然后加入到上述体系中，轻轻震荡混匀；

- (2) 加入 500 μL PEG/LiAc，混匀后置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 30 min，每 10 min 混匀 1 次（轻微）；
- (3) 加入 70 μL DMSO，混匀，42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min，每 5 min 混匀 1 次（轻微）；
- (4) 冰上放置 1-2 min；
- (5) 室温，7000 r/min，离心 1 min，菌体重悬于 0.5 mL 1 \times TE 溶液中；
- (6) 将菌液涂布在 SD/-Trp or SD/-Leu 平板上，每个 100 mm 的平板涂菌液 200 μL （按照 1/10、1/100、1/1000 的比例稀释菌液，检测转化效率）；
- (7) 将平板倒置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中，培养 3 d，长出单菌落。

◇ 酵母双杂交

- (1) 挑取诱饵质粒 pGBKT7、pGADT7-Rec 转化 Y187 的单克隆（2-3 mm）分别接种于 500 μL SD/-Trp/Kan（20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）液体培养基 1.5 mL 旋口离心管中。30 $^{\circ}\text{C}$ 50 r/min 培养过夜（16-24 h）；
- (2) 取 1 滴菌液，显微镜下观察酵母交配的进程（酵母若交配成功，则呈现三个细胞相连的状态，其中两个是单倍体的母本细胞，第三个是出芽的二倍体细胞），如果交配成功，继续培养 4 h；
- (3) 1000 g 离心 10 min 后，用 0.5 mL 的 0.5 \times YPDA/Kan（50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）重悬；
- (4) 100 μL 杂交混合物备用（将剩余的杂交混合物），将 200 μL 菌体均匀涂布在含有合适浓度 3-AT 的 SD/-His/-Leu/-Trp 平板（100 mm）上，用封口膜封闭好，30 $^{\circ}\text{C}$ ，倒置培养 3-5 d，至长出单菌落；

- (5) 将单菌落转移至含有合适浓度 3-AT 的 SD/-His/-Leu/-Trp/-Ade 平板上, 30 °C, 倒置培养 3-5 d。

✧ X-gal 染色验证阳性克隆

- (1) 新鲜的, 划线培养的单菌落, 30°C, 2-4 d (直径 1-3 mm); 用铅笔在滤纸上画 8×8 的方格, 每个方格放置一个新鲜培养的单菌落并记录下编号;
- (2) 按照附录的方法配制 Z buffer/X-gal 反应液;
- (3) 在干净平皿中铺一张滤纸, 用 Z buffer/X-gal 反应液 (2.5-5 mL) 将滤纸浸湿;
- (4) 用镊子另取一张无菌、干燥的滤纸, 铺在划线培养的酵母菌表面, 用镊子轻轻滚压, 使菌转移到滤纸表面 (注: 在滤纸上做好方位标记, 以便识别菌种编号);
- (5) 当滤纸全部湿润, 用镊子将铺有菌落的滤纸放入液氮中速冻 30 sec, 液氮需没过菌落;
- (6) 取出滤纸, 放置于一干净平皿中使其室温解冻;
- (7) 用镊子将解冻的滤纸轻轻叠放在浸有反应液的滤纸上 (有菌的表面朝上), 保证两层滤纸间没有气泡; 30°C, 培养 8 h, 观察 X-gal 染色情况。菌落变为蓝色的为阳性, 超过 8 h 变蓝, 很有可能是假阳性。

染色质免疫共沉淀 (ChIP)

✧ 提取染色质

- (1) 取水稻抽穗早期倒 1, 2, 3 节茎秆, 倒 1, 2, 3 片叶和幼穗各至少 2 g, 将材料尽可能剪碎, 放入 50 mL 离心管中, 加入 40 mL 灭菌 ddH₂O 清洗一遍, 用灭菌滤纸吸干水分。加入 1% 甲醛交联液 30 mL, 真空交联 15-30 min (尽量使样品浸没在交联液中);
- (2) 交联完毕后, 加入甘氨酸至终浓度 0.125 mol/L (2 mol/L Glycine 母液), 混匀后抽真空 5 min 终止交联反应;
- (3) 用 40 mL 灭菌 ddH₂O 将样品清洗 3 遍, 之后取出样品, 放在多层灭菌滤纸间, 尽量吸干水分。之后将交联好的样品放入液氮中, 置于 -70°C 保存 (也可直接进行下一步);

- (4) 用 50 mL 离心管量取 30 mL 的 Extraction Buffer 1 放在冰上预冷（一份样品量）；
- (5) 取出交联好的样品，用液氮充分研匀成粉末，转入 50 mL 离心管，加入 30 mL 预冷的 Extraction Buffer 1，盖好盖子，迅速摇匀，将离心管置于旋转混匀仪上于 4 °C 抽提 30 min 至均匀的悬浮液；
- (6) 将单层膜布（miracloth）置于干净漏斗上，过滤样品悬浮液至新的 50 mL 离心管中，换用双层膜布重复过滤一次；
- (7) 用 Extraction Buffer 1 平衡离心管，4 °C，4000 g，离心 20 min；
- (8) 离心结束后立即取出离心管，小心倒去上清，加入 1 mL Extraction Buffer 2，对准离心管壁的沉淀部分反复轻柔吹洗，重悬沉淀，然后将重悬液转入 1.5 mL 离心管中；
- (9) 4 °C，16000 g 离心 10 min；
- (10) 用枪吸干上清，加入 500 μ L Extraction Buffer 3 在冰上重悬染色质沉淀；
- (11) 取一新的 1.5 mL 离心管，加入 500 μ L Extraction Buffer 3，然后将上一步中的重悬液转移至其上；
- (12) 4 °C，16000 g 离心 1 h。

◇ 超声波处理

- (1) 吸干上清，加入 300 μ L Nuclear Lysis Buffer 至染色质沉淀中，重新在核裂解液中重悬染色质；
- (2) 每个样品取出 2 μ L 保存，作为超声处理前的对照；剩余的样品用超声波细胞破碎仪将染色质打断成合适大小的 DNA 片段（用 Biorupter H 档，冰水混合物中，30 s ON，30 s OFF，25 个 cycles，打成 100-500 bp）；
- (3) 取 10 μ L 片段化之后的染色质裂解液和超声前的 2 μ L 对照分别加入 500 μ L 灭菌 ddH₂O 和 20 μ L 5 mol/L NaCl，65 °C 水浴解交联过夜（4 h 以上）。剩余的染色质片段化裂解液存于 -20 °C；
- (4) 取出解交联产物，加入等体积的酚：氯仿：异戊醇（25：24：1），手摇混匀 5 min，16000 g 离心 10 min。小心吸取上清 480 μ L 左右至新离心管中，加入 100 μ L 3 mol/L NaAc，900 μ L 预冷的无水乙醇和 2 μ L 肝糖原，置于 -70 °C 沉淀 1 h 或 -20 °C 过夜；

- (5) 4 °C, 16,000 g 离心 20 min, 小心弃上清, 加入 1 mL 70%乙醇洗沉淀一次, 4 °C离心 16,000 g, 5 min, 小心弃上清, 稍离心, 用枪头小心吸干剩余残液, 之后将离心管置于超净台上风干大约 15-30 min, 加入 15 μ L ddH₂O 溶解 0.5 h 以上, 用 1.5%-2%浓度的琼脂糖凝胶进行检测, 若片段大小符合预期则进行下一步实验, 如果片段过大, 则可继续进行超声波处理。

✧ ChIP

- (1) 在 1.5 mL 离心管中加入 1 mL ChIP Dilution Buffer (3 管), 加入充分悬浮的 protein A agarose beads 40 μ L, 上下颠倒混匀, 4 °C, 1000 g, 30 s, 小心弃 1 mL 上清。重复此步骤 2 次;
- (2) 取出存于-20 °C的染色质裂, 解冻后 4 °C, 16,000 g 离心 5 min, 去除核碎片, 若去除不干净, 可重复一次。取出 20 μ L 作为 input 对照, 冻存于-20 °C;
- (3) 计算染色质裂解液剩下的体积, 用 ChIP Dilution Buffer 补充体积至 3 mL。混匀后在步骤 (1) 中的 3 管 protein A 中各加入 1 mL。将离心管置于旋转混匀仪上, 4 °C, 旋转混匀 1 h;
- (4) 4 °C, 12,000 g 离心 2 min;
- (5) 转移上清到 3 个新离心管 (注意避免吸入 beads), 并做上相应抗体的标记和无抗体对照标记;
- (6) 在 2 个做了抗体标记的离心管中加入 5 μ g 左右抗体, 另一个无抗体对照离心管内不加抗体。4 °C, 旋转混匀仪上孵育过夜 (6 h 以上);
- (7) 在孵育过夜的离心管中各加入 50 μ L protein A agarose beads, 4 °C, 旋转混匀仪上孵育 1 h;
- (8) 准备 ChIP Elution Buffer, Low Salt Wash Buffer, High Salt Wash Buffer, LiCl Wash Buffer, TE Buffer;
- (9) 离心收集沉淀, 并按照以下步骤洗脱 8 次, 每种清洗液 2 次, 每次用 1 mL 洗脱液, 在 4 °C轻轻混匀。每次清洗完后在 4 °C, 5000 r/min 离心 30 s;
 - a. Low Salt Wash Buffer: 150 mmol/L NaCl, 0.1% SDS, 1% TritonX-100, 2 mmol/L EDTA, 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.1)。2 次, 一次快速, 第二次 4 °C, 旋转混匀仪洗 5 min;

- b. High Salt Wash Buffer: 500 mmol/L NaCl, 0.1% SDS, 1% TritonX-100, 2 mmol/L EDTA, 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.1)。2次, 一次快速, 第二次 4°C, 旋转混匀仪洗 5 min;
 - c. LiCl Wash Buffer: 0.25 mmol/L LiCl, 1% NP40, 1% sodium deoxycholate, 1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.1)。2次, 一次快速, 第二次 4°C, 旋转混匀仪洗 5 min;
 - d. TE Buffer: 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.1), 1 mmol/L EDTA。2次, 一次快速, 第二次 4 °C, 旋转混匀仪洗 5 min。
- (10) 在所得的沉淀中加入 250 μ L Elution Buffer。快速震荡混匀, 65 °C 孵育 15 min, 轻柔旋转颠倒混匀。5000 r/min, 30s 离心, 小心取上清至新的 1.5 mL 离心管中;
- (11) 将沉淀的 beads 重复一次洗脱, 将 2 次的上清混合在同一离心管中;
- (12) 取出冻存的 input 对照, 加入 500 μ L ddH₂O, 然后分别在 input 和洗脱后的染色质中加入 20 μ L 5 mol/L NaCl, 65 °C 水浴解交联 6 h 以上;
- (13) 在解交联产物中加入 10 μ L 0.5 mol/L EDTA, 20 μ L Tris-HCl pH 6.5, 2 μ L Proteinase K (20 mg/mL) 和 1 μ g RNase A, 45 °C 水浴 1 h;
- (14) 取出离心管, 加入等体积的酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1), 手摇混匀 5 min, 16,000 g 离心 10 min, 吸上清 (480~500 μ L) 至新离心管中, 加入 100 μ L 3 mol/L NaAc, 900 μ L 预冷的无水乙醇和 2 μ L 甘糖原, 置于 -70 °C 1 h 以上或 -20 °C 过夜;
- (15) 4 °C 离心, 16,000 g, 20 min, 小心弃上清, 加入 1 mL 70% 乙醇洗盐, 4 °C 离心 16,000 g, 5 min, 小心弃上清, 稍离心, 用枪头小心吸干剩余残液, 之后将离心管置于超净台上风干大约 15-30 min, 加入 20 μ L 灭菌 ddH₂O 溶解 0.5 h 以上;
- (16) 用 Picogreen assay (Invitrogen Q-bit) 和 Agilent BioAnalyzer DNA 1000 chip 分别对 DNA 的浓度进行测定, 之后样品置于 -20 °C 保存或进行后续分析。

细胞学实验

琼脂糖包埋震动切片

- (1) 取样；
- (2) 包埋：样品浸没到热的 4% 琼脂糖凝胶中（凝胶温度约 60°C），冷却；
- (3) 修块：将包埋有样品的琼脂糖块用手术刀修块去除多余的琼脂糖；
- (4) 用 502 胶水将包埋有样品的琼脂糖块固定在振动切片机的载物台上；
- (5) 根据需要设置振动切片机参数，水稻茎秆切片厚度可以设置 50-100 μm 之间。

石蜡包埋半薄切片

- (1) 取样：将新鲜组织切成 3-5 mm 长度；
- (2) 固定：浸没在 4% 的多聚甲醛（多聚甲醛刚刚没过材料为好）中进行固定；于真空抽气机中抽气 10 min 左右；
- (3) 脱水：依次用 30% → 40% → 50% → 60% → 75% → 80% → 90% → 95% → 100% 的酒精进行逐级脱水，每级 40-60 min，可根据材料的幼嫩程度而定；
- (4) 透明：依次用 1/3，2/3，纯二甲苯逐级透明，每级 40-60 min，该步骤与前面脱水步骤相似；
- (5) 浸蜡：将材料导入带网孔的铝盒中，70°C 烘箱中依次浸入 50% 和 75% 的石蜡各 2 h，100% 石蜡 3 h；
- (6) 包埋：将包埋用的蜡块煮溶后倒入纸方盒中，捞出铝盒中的材料垂直浸入溶蜡中，待蜡凝固后，将纸盒飘在水上，过夜凝固；
- (7) 切片：修块时使样品垂直于底面，用石蜡切片机（RM2265，Leica）进行切片，切片厚度为 8 μm ；
- (8) 展片、烘片：将切好的蜡带平铺在多聚赖氨酸处理的载玻片上，于 37°C 展片台展片后放置于 37°C 干燥箱中干燥 3 天；
- (9) 脱蜡：将烘干的载玻片浸入纯二甲苯溶液中脱蜡 30 min，拿出后至于纯二甲苯透明 5 min；

- (10)复水：依次经过 100% → 95% → 90% → 80% → 75% → 50% → 30%的乙醇溶液中约 1 min，最后放入单蒸水中。切片制备好后待用。

树脂包埋超薄切片

- (1) 取样：将新鲜组织切成 3-5 mm 长度；
- (2) 固定：迅速放入装有甲醛/丙二醛固定液的玻璃瓶中（固定液没过材料）；于真空抽气机中抽气 30 min，固定 2-3 h；
- (3) 洗样：用 25 mM 磷酸缓冲液清洗 3 次，每次 5 min，再用纯水洗 2 次；
- (4) 脱水：依次用 35% → 50% → 70% → 100% → 100% 酒精进行逐级脱水，每级 25-30 min；
- (5) 浸透：用 LR White: 100% 酒精（1: 1, v/v）浸透材料 12-24 h，再用 100% LR White（Medium grade, Ted Pella, 18181）浸透材料 12-24 h，重复 3 次；
- (6) 包埋：将胶囊（Ted Pella, 130-14）固定在枪头盒内，用滴管灌满 100% LR White，再将浸透好的样品放入胶囊中，使样品水平居中，盖紧胶囊盖（尽量排除空气）；
- (7) 聚合：4°C下，用紫外仪聚合 48 h；
- (8) 修片：用剃须刀片修出表面积最小且平整的切片台；
- (9) 切片：用 Lecic EM UC6 超薄切片机，配合钻石刀（瑞士 Diatome）切出 250 nm 薄片；
- (10)展片：用睫毛笔将颜色均一的薄片，平整的铺展于载玻片上，样品间需要保持足够的距离，以防免疫实验组互相污染，每张载玻片按照 6-8 个样品排布（3×2 或者 4×2）；
- (11)烘片：在展片台上，50°C烘干，并用记号笔在载玻片背面圈出样品所在位置（直径 7-8 mm 的圆圈）。

叶片细胞形态学观察

- (1) 取新鲜叶片，加入 12.5%（10 mL 冰乙酸 + 70 mL 无水乙醇）冰乙酸常温摇 30 min；

- (2) 无水乙醇洗 15 min;
- (3) 50% (v/v) 乙醇洗 15 min;
- (4) ddH₂O 洗 15 min;
- (5) 加入 1 mL 1 mol/L NaOH 重悬;
- (6) 利用激光共聚焦显微镜观察细胞形态。

纤维素染色观察

- (1) 切片加入 10 μL Calcofluor White Stain (Fluka), 室温染色 5 min;
- (2) 滤纸吸干多余的 Calcofluor;
- (3) 用 ddH₂O 洗 3 次, 去除残余的 Calcofluor;
- (4) 压片观察: 在正置荧光显微镜 (Olympus BX-61) 下 UV 激发观察。

木质素染色观察

取抽穗期茎秆第二节间徒手切取横切面染色, 滴 1-2 滴 5% 间苯三酚 [乙醇: 水 = 95: 5 (v/v)] 和浓盐酸染色 2 min 后置于显微镜 (Nikon 80i 荧光显微镜) 下观察拍照。

多糖抗体免疫荧光观察

- (1) 封闭: 切片用 3% (0.03 g/mL) 脱脂奶粉/PBS 溶液封闭 1 h。加了封闭液的玻片平放在密闭保湿的铁盒中, 遮光;
- (2) 多糖单克隆抗体标记: 用 3% 脱脂奶粉/PBS 溶液稀释的抗体血清处理切片材料约 2 h (CCRC 系列 5 倍稀释, JIM 系列 10 倍稀释) (每张片子约 10 μL); 2 h 后用 PBS 溶液清洗载玻片 3 次, 每次 5 min;
- (3) 二级荧光抗体标记: 二抗暗下处理载玻片 2 h。羊抗小鼠 (Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG (H + L), Invitrogen, A11001) 结合 CCRC 系列, 羊抗大鼠 (Alexa Fluor 488 anti-rat IgG (H + L), Invitrogen, A-11006) 结合 JIM 系列;
注: 两种二抗均偶联有 FITC (Fluorescein-isothiocyanate), 且均用 PBS 稀释 200 倍后使用。

- (4) PBS清洗3次，每次5 min；
- (5) 加10 μ L Calcofluor染色5 min；
- (6) 用PBS尽量将蓝色清洗干净；
- (7) 压片后用Olympus BX-61显微镜U-MWU2滤光器（激发波长为330-385 nm）观察Calcofluor染色图像（蓝色荧光）；U-MWB2滤光器（激发波长为460-490 nm）观察单克隆抗体染色图像（FITC绿色荧光）。

注意：

1. 一抗和二抗每次按需稀释，多次使用易失效；
2. 加入二抗后注意避光，放置荧光衰退；
3. 建议将抗体原液分装。较常使用的4 $^{\circ}$ C存放，其余-20 $^{\circ}$ C存放，多次冻融易失效。

多糖量子点免疫荧光观察

- (1) 封闭：切片用3%（0.03 g/mL）脱脂奶粉/PBS溶液封闭1h。加了封闭液的玻片平放在密闭保湿的铁盒中，遮光；
- (2) 多糖单克隆抗体标记：用3%脱脂奶粉/PBS溶液稀释的抗体血清处理切片材料约2 h（CCRC系列5倍稀释）（每张片子约10 μ L）；2 h后用PBS溶液清洗载玻片3次，每次5 min；
- (3) 二级荧光抗体标记：二抗暗下处理载玻片4 h。羊抗小鼠（Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG（H + L），Invitrogen, A11001）结合CCRC系列；
注：二抗偶联有量子点（Quantum dots）（CdSe/ZnS, 610 nm），用PBS稀释100倍后使用。长期放置的量子点溶液使用前可进行超声，降低沉聚现象。
- (4) PBS清洗3次，每次5 min（每次清洗可辅以滤纸）；
- (5) 压片后用Olympus BX-61显微镜U-MWU2滤光器（激发波长为330-385 nm）观察量子点染色图像（蓝色荧光）。

注意：

1. 一抗和二抗每次按需稀释，多次使用易失效；
2. 加入二抗后注意避光，放置荧光衰退；

3. 建议将抗体原液分装。较常使用的4°C存放，其余-20°C存放，多次冻融易失效。

拟南芥种子果胶质免疫荧光观察

- (1) 取约 20 粒拟南芥种子，加入 500 μL ddH₂O，静置 5 min；
- (2) 去除 470 μL ddH₂O，加入 100 μL 封闭液（5% BSA 溶解于 pH 7.0 PBS 溶液），反应 30 min；
- (3) 去除封闭液，加入 50 μL 一抗（1: 10 稀释在含 1% BSA 的 pH 7.0 PBS 溶液中），反应 90 min；
- (4) 去除一抗，加入 300 μL PBS 溶液，轻轻摇动 1-2 次，去除 PBS 溶液；
- (5) 重复步骤（4）4 次；
- (6) 加入 100 μL 二抗（1: 100 稀释在含 1% BSA 的 pH 7.0 PBS 溶液中），黑暗的条件下反应 90 min；
- (7) 去除二抗，加入 300 μL PBS 溶液，轻轻摇动 1-2 次，去除 PBS 溶液；
- (8) 重复步骤（4）4 次；
- (9) 小心转移种子到载玻片上，利用激光共聚焦显微镜观察。

胍胍质测定与观察

✧ 胍胍质含量的测定

- (1) 取 0.1 g 样品，用液氮磨碎；
- (2) 转移至 2.0 mL 离心管中，加入 1.0 mL 的 80%乙醇，震荡 5 min；
- (3) 1200 r/min 离心 5 min，去上清，重复 5 次，去掉色素；
- (4) 沉淀加入加 600 μL 的 1 mol/L NaOH，80°C水浴 30 min；
- (5) 1200 r/min 离心 5 min，取上清 50 μL ，加入苯胺蓝反应液 600 μL （40 mL 0.1% 苯胺蓝，21 mL 1 mol/L HCl 和 59 mL 1 mol/L 甘氨酸/NaOH 缓冲液混匀，pH 9.5），50°C水浴 30 min；
- (6) 室温 90 r/min 摇 30 min；
- (7) 1200 r/min 离心 5 min，取上清用紫外分光光度计或酶标仪测定（激发波：

400 nm, 发射波: 510 nm)。以海带多糖为标准品来制作标准曲线 (10, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$)。

◇ 胼胝质沉积观察

- (1) 取水稻接白叶枯 24 h 后 2 cm 长叶片, 放入 95% 乙醇溶液中浸泡过夜;
- (2) 置于 0.1% 苯胺蓝染液 (pH 7.0 的磷酸缓冲液配制) 中染色 4 h;
- (3) 蒸馏水洗 3 次, 在荧光显微镜下用紫外光激发, 观察胼胝质的沉积部位、大小和数量。

GUS 染色观察

- (1) 取待检测的组织放入 1.5 mL 离心管中, 加入 90% 丙酮固定, 冰上静置 30 min;
- (2) 倒掉丙酮, 用清洗缓冲液清洗 (避光处理), 冰上静置 30 min 后重新清洗;
- (3) 倒掉清洗缓冲液, 将样品放入 GUS 染色液中, 37°C 避光过夜后用 70% 乙醇脱色, 直到叶片背景退去;
- (4) 将样品放在体视显微镜下观测并拍照。

水稻原生质体分离与激光共聚焦观察

- (1) 水稻种子消毒后, 种植在 1/2 MS 培养基上, 培养 9-12 d, 9 天最佳;
- (2) 在灭菌的培养皿上, 用锋利的剃须刀片将叶片中部切断, 取第一片叶子与种子之间的这一段 (9 cm 左右)。将其切成 0.5-1 mm 的片段, 越碎越好。对于一般实验, 用 10-20 株苗在 5-10 mL 的酶解液中酶解可以得到 $0.5-1 \times 10^6$ 个原生质体, 足够 25 个样品的转化及分析;
- (3) 迅速、轻巧的将切好的叶段转移至准备好的酶解液中, 用平头镊子将叶段完全浸入酶解液中。在真空干燥中黑暗条件下真空渗透 30 min, 压力不超过 0.8 MPa;
- (4) 在黑暗条件下, 室温继续酶解 80 r/min, 3 h 以上 (酶解液经轻微的晃动后应变为绿色);

- (5) 显微镜下观测酶解液中的原生质体，用血球计数板检测酶解出的原生质体。
加入 10 mL W5 solution 继续摇 10 min;
- (6) 清洗 2 张保存在乙醇中的 37 μm 尼龙网，在使用前用 W5 solution 润洗;
- (7) 200 目过滤酶解液。用 10-20 mL W5 solution 再次悬浮剩余水稻碎片。收集过滤液在 10 mL 离心管中;
- (8) 室温离心 100 g 8min。转移上清到干净离心管中，不要完全吸干上清，原生质体会沉积在离心管底部;
- (9) 加入 1-3 mL W5 solution 重悬原生质体，注意将枪头剪口子大一点，将原生质体转移至 15 mL 圆底培养管。使原生质体浓度调至 $2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 。用锡箔纸包住，在冰上静置原生质体 30 min（可在冰上保存 24 h），用锡纸包住圆底培养管。原生质体会沉至瓶底;
- (10) 重悬后的原生质体用于激光共聚焦观察。

扫描电镜观察

- (1) 取样：目的水稻组织（茎秆切成 1-2 mm 厚的小块，颖壳不需要切）迅速置于 2.5% 戊二醛固定液中，抽真空 2 h，4°C 或室温固定 1 周以内。送至华中农业大学电镜平台制样（水稻成熟期干燥的种子横截面不需固定等处理，直接粘样，喷金，观察）。
- (2) 粘样：样品台上粘双面的导电胶，将要观察的样品表面向上粘在导电胶上。粘样时，不能碰到要观察样品的表面。要观察截面的样品，用双面刀片滑切出样品截面，截面向上将样品薄片粘在导电胶上。
- (3) 喷金：将样品台放在离子溅射仪中，打开仪器开始抽真空，当真空达到 5.0 Pa 后，点 start 按钮进行喷金。
- (4) 扫描电镜观察：样品台固定在样品座上，放入扫描电镜样品仓，抽真空待 HT 变蓝后，加高压，选择感兴趣区域放大聚焦，SCAN3 慢扫获得照片。

透射电镜观察

◇ 水稻叶脉透射电镜观察

- (1) 选取三叶期（水培 2 周左右）水稻新叶的长度约 13 cm 的叶片，从叶尖量取第 7-8 cm 的区段，小心切割叶脉；
- (2) 将上述叶脉切成 2-3 mm 长小段，置于戊二醛固定液中；
- (3) 样品送华中农业大学电镜平台进行后续包埋、切片等处理；
- (4) 透射电镜（Hitachi H7500）观察叶脉中厚壁组织的细胞壁。

◇ 拟南芥节间透射电镜观察

取始抽薹期的拟南芥第一节间，切成 1 mm × 1 mm 小块，将样品戊二醛固定，送华中农业大学电镜平台进行后续处理，进行透射电镜观察。

原子力显微镜观察

◇ 水稻纤维素微纤丝观察

- (1) 取水稻抽穗早期的倒二节茎秆基部 3 cm，用琼脂糖包埋震动切片技术切 50-100 μm 厚度的半横切片；
- (2) 准备干净的玻片，用含 1% HCl 的 70% 乙醇进行超声洗涤，然后用 poly-L-lysine solution (P8920; Sigma; 1: 10) 进行包裹玻片表面 5 min，然后 60°C 烘烤 1 h；
- (3) 在处理好的玻片的表面固定住水稻茎秆切片，放置在真空罐中，等待 AFM 上机操作；
- (4) AFM (Agilent 5500, 电镜平台) 常规操作参数：AFM 探针选定曲率半径小于 10 nm 的氮化硅探针 (0.1 N/m)，悬臂梁表面镀 Ni 250 和 Au 180；选定 Top MAC 模式，I gain: P gain = 1: 3 (大小根据图片噪音手动调节)，振幅大小在 2 V 左右为宜，扫描速度：1 ln/s，扫描分辨率：512 × 512；若在液体中扫图，需加上 liquid cell 配件；
- (5) AFM (Agilent 5500, 识别模块 (徐炳乾组)) CBM3a 识别图像操作参数：基于以上常规操作，需要多开一个 Recognition Signal 的频道，同时在

Tris-Cl buffer (10 mmol/L Tris-Cl 和 150 mmol/L NaCl, pH 7.5) 中扫图;

CBM3a 探针修饰方法:

在 0.1 N/m 的氮化硅探针的悬臂梁的针尖镀 Ni 50 和 Au 150, 然后放置在 HS-PEG2000-NTA cross linker (0.2 mg/mL, 1400 μ L) 里面避光孵育 4 h, 然后在 NiCl₂ (10 mmol/L, 20 μ L) 涮洗 1 h, 最后加入 400 μ L Tris-Cl buffer (10 mmol/L Tris-Cl and 150 mmol/L NaCl, pH 7.5) 和 CBM3a (27 μ g /mL, 6 μ L) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 次日用 Tris-Cl buffer 洗 3 次以上以备识别用途。注意: 保存在 4 $^{\circ}$ 冰箱, 有效期 1-2 周。

✧ 拟南芥幼苗细胞壁杨氏模量测定

- (1) 取生长 60 天的拟南芥基部 1 cm, 液氮碾磨均匀, 无菌水洗 5 次, 磷酸 buffer 洗 1 次;
- (2) 96% 乙醇 70 $^{\circ}$ C 处理 30 min, 乙醇洗一次;
- (3) 氯仿: 甲醇 (2: 3) 洗 2 次, 甲醇洗一次, 丙酮洗一次;
- (4) 65%, 80%, 100% 乙醇干燥, 冷冻干燥;
- (5) 超纯水悬浮 AIR, 用移液器吸打在新拨开的云母片上室温过夜干燥, 然后用双面胶固定在圆形金属片, 放置在 AFM (Bruker multimode, 资环学院) 的扫描管上进行力学性能测定;
- (6) 使用硬针 (曲率半径为 8 nm, 弹性常数为 40 N/m), 其中弹性常数用 Sader method 进行矫正, 在测量前偏折敏度须多次测量取均值;
- (7) 选择 10 \times 10 μ m 的扫描区域, 均匀测试 16 \times 16 个点, 重复 10 个不同的细胞碎片;
- (8) 杨氏模量测定使用 Hertz 模型计算, 计算所用软件为 NanoScope analysis。

水稻农艺性状分析

机械力学性状考察

◇ 倒伏指数测定

- (1) 测定单个分蘖的高度 H (cm);
- (2) 称量单个分蘖的鲜重 W (g);
- (3) 利用茎秆强度测定仪 (YYD-1, 浙江托普仪器有限公司) 测定倒三节节间的折断力 F (N), 测量间距为 5 cm;
- (4) 按照如下公式计算倒伏指数:

$$\text{倒伏指数} = H \times W / (F/9.8 \times 1000 \times 5) \times 100$$

并利用 SPSS 软件对测量结果进行统计分析。

◇ 机械拉力测定

- (1) 单独分离倒二节节间;
- (2) 统一从生物学上端测量 8 cm 长度, 利用电脑抗张测试仪器 (RH-K300 广州润湖仪器公司) 测定倒二节节间的机械拉断力。仪器参数 (定量 $W = 120 \text{ g/m}^2$; 夹距 $D = 50 \text{ mm}$; 速度 $V = 10 \text{ mm/min}$; 断裂值 $S = 255 \text{ N}$);
- (3) 利用 SPSS 软件对测量结果进行统计分析。

水稻考种

收获成熟期的水稻材料, 在阳光下晾晒数日, 保证足够干燥。统计单株穗重, 单株秆重, 每株有效分蘖数、每穗粒数、结实率、千粒重 (随机取已脱粒饱满水稻 100 粒, 用分析天平测定百粒重, 换算成千粒重)。每株随机取 10 粒灌浆饱满的谷粒, 用电子游标卡尺测量粒长、粒宽和粒厚。

稻米品质测定

◇ 外观品质的测定

- (1) 种子收获后常温储藏 3 个月完成后熟并达到水分平衡，每份样品称两份 20 g 左右的稻谷小样。通过砻谷机（SY88-TH, BRIC, Korea）去壳加工成糙米。然后每份小样取 10 g 左右的糙米用精米机（Pearlest, Kett, Japan）加工成精米。精米再通过碎米分离器（JFQS-1320, China）选出整精米；
- (2) 通过扫描仪（Epson Expression 1680 Professional, Epson, America）得到整精米的扫描图像。然后用图像分析软件基于颜色对整精米的扫描图像进行分析，识别出米粒部分及其中的垩白部分的数量和面积及米粒的长宽。统计计算出垩白粒率、垩白度、粒长、粒宽、长宽比等稻米外观品质指标。

◇ 蒸煮食味品质的测定

（一）碘蓝比色法测定直链淀粉含量

- (1) 用旋风式粉碎机（Udy corporation, Colorado, USA）将精米碎成粉，过 100 目筛后装入封口塑料袋备用；
- (2) 称取 100 mg 粉样，以 95% 乙醇湿润，再加 9 mL 的 1 mol/L NaOH；
- (3) 37°C 下糊化 16 h，取出，定容于 50 mL 容量瓶；
- (4) 吸取 2 mL，放入另一个 50 mL 容量瓶中，加水至一半，再加 1 mL 的 1 mol/L HAc，加入 2 mL 碘试剂，定容，摇匀；
- (5) 静置 20 min 后在 620 nm 波长下比色，以空白溶液调零；
- (6) 制作标准淀粉含量曲线，求出各样品中直链淀粉含量。

（二）胶稠度测定方法

准确称取精米粉样 100 mg，置于 10 mL 试管内。加入百里酚蓝指示剂，加入 2 mL 0.2 mol/L 的 NaOH 的溶液。混匀后立即沸水浴，用玻璃珠盖住试管口，通过调节试管的受热面积，使沸腾的米胶高度维持在试管长度的 2/3 左右，糊化后，取出试管，拿下玻璃球，室温冷却后放入冰水浴中冷却。然后，将试管平放在水平台上后，量出冷胶前沿至试管底的长度，即为样品的胶稠度（单位为 cm）。

（三）糊化温度测定

糊化温度用测定碱消值（ASV）的方法间接衡量。取 6 粒成熟饱满的整精米置于平皿内，加入 10 mL 浓度为 1.7% 的 KOH 溶液，用玻璃棒将盒内米粒排布均匀，加盖。将方盒平移至 30°C 的恒温室内，保温约 24 h 后，再平稳地取出，逐粒目测米粒的分解情况进行分级，取平均值作为其糊化温度。每个样品至少测定 3 次。ASV 与糊化温度刚好相反，高的 ASV 对应低的糊化温度，反之亦然。

（四）蛋白质含量测定

蛋白质含量用近红外建模方法分析。取 7 g 左右的整精米，用近红外谷物分析仪（Infratec 1241, FOSS NIRSystems Inc, USA）的微量进样器进样扫描，根据已有的模型预测蛋白质含量。

淀粉含量测定

采用 Megazyme 淀粉总量试剂盒测定方法：

- (1) 将谷物磨成可以通过 0.5 mm 筛网的粉末；
- (2) 将粉状样品（准确称量 100 mg）加入到试管中（16 mm × 120 mm），拍打试管以确保全部样品位于试管底部；
- (3) 加入 0.2 mL 乙醇溶液（80%，v/v）使样品润湿并有助于分散，用涡旋混合器混匀；
- (4) 立即加入 3 mL 耐热 α -淀粉酶（1: 30 稀释于 100 mmol/L, pH 5.0 的醋酸钠缓冲液中）。沸水孵育试管 6 min（每 2 min 振荡试管 1 次）；
- (5) 将试管放置于 50°C 的水浴锅中，然后加入 0.1 mL 淀粉糖苷酶（试剂盒提供），涡旋混匀，在 50°C 下孵育 30 min；
- (6) 将试管中全部的溶液转移到 100 mL 的容量瓶中。用洗瓶彻底漂洗试管，并将洗液转入容量瓶中，然后用蒸馏水调整溶液体积，充分混匀。取单位体积溶液离心（3,000 r/min, 10 min），使用清澈、未稀释的溶液检测；
- (7) 取 2 份稀释的单位体积的样品溶液（0.1 mL）分别转移到圆底试管中（16 mm × 100 mm）；

- (8) 取 3.0 mL GOPOD 试剂加到每一个试管中（包括葡萄糖对照试剂空白），然后再 50°C 下孵育 20 min。其中，葡萄糖对照包括 0.1 mL 葡萄糖标准溶液（1 mg/mL）+ 3.0 mL GOPOD 试剂。试剂空白溶液包括 0.1 mL 水和 3.0 mL GOPOD 试剂；
- (9) 在 510 nm 下测定每一个样品和葡萄糖对照于试剂空白的吸光度值。

结果计算：

固体样品：

$$\text{淀粉}(\%) = \Delta A \times F \times \frac{FV}{0.1} \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{w} \times \frac{162}{180} = \frac{\Delta A \times F \times FV \times 0.9}{W}$$

ΔA = 相当于试剂空白读取的吸光度值（反应）

$$F = \text{吸光度值转换为葡萄糖}(\mu\text{g}) \text{的系数} = \frac{100 \text{ (D-葡萄糖的重量 } \mu\text{g)}}{100 \mu\text{g D-葡萄糖的吸光度}}$$

FV = 最终体积

0.1 = 用于检测的样品体积

$$\frac{1}{1000} = \text{从 } \mu\text{g} \text{ 到 mg 的转换}$$

$$\frac{100}{W} = \text{一定重量干粉中淀粉含量以百分比表述的系数}$$

$$\frac{162}{180} = \text{淀粉中游离的 D-葡萄糖转化为 D-葡萄糖苷的系数}$$

$$\text{淀粉} \% \text{ W/W (干重)} = \text{淀粉} \% \text{ W/W (上述算法结果)} \times \frac{100}{100 - \text{含水量} (\% \text{ W/W})}$$

计算（液体样品；mg/100 mL）

$$\text{淀粉} = \Delta A \times F \times \frac{100}{0.1} \times \frac{1}{1000} \times \frac{162}{180} \times 2 \times D = \Delta A \times F \times D \times 1.8$$

ΔA = 相当于试剂空白读取的吸光度值（反应）

$$F = \text{吸光度值转换为葡萄糖}(\mu\text{g}) \text{的系数} = \frac{100 \text{ (D-葡萄糖的重量 } \mu\text{g)}}{100 \mu\text{g D-葡萄糖的吸光度}}$$

100 = 样品体积转换到 100 mL

0.1 = 用于检测的样品体积

$\frac{1}{1000}$ = 从 μg 到 mg 的转换

$\frac{162}{180}$ = 淀粉中游离的 D-葡萄糖转化为 D-葡萄糖苷的系数

2 = 在用 AMG 孵育时样品溶液的稀释

D = 孵育混合物稀释倍数

光合速率测定

按照 LI-6400 便携式光合测定仪操作说明进行，取正常种植的处于灌浆期的代表性植株，测定部位为生长一致且受光方向相同的剑叶的中部上表面。测量时间点为 11:00-13:00，测定时采用内置光源。

稻瘟病抗性分析

◇ 孢子液准备

- (1) 稻瘟菌分生孢子用燕麦培养基放在温度 28°C ，12 h 光照/12 h 黑暗的光照培养箱培养 10 d；
- (2) 收集分生孢子，无菌水重新悬浮孢子，用血小板计数器将孢子浓度调到 10^5 个/mL，对照用不含孢子的灭菌的蒸馏水，接种前加入 0.02% 的吐温溶液进行喷雾接种。

◇ 活体接种

- (1) 生长约 3 周处于三叶一心期水稻幼苗进行叶片喷雾接种试验；
- (2) 喷雾接种结束后，用黑色塑料袋将每盆水稻单独密封放入光照培养箱，湿度 90%， 28°C ，暗培养；
- (3) 24 h 后 12 h 光照/12 h 黑暗光照培养，用透明保鲜膜将材料封好以便保湿，接种 5 d 后取水稻叶片进行拍照，统计病斑数目和长度。

◇ 体外接种

- (1) 取生长约 3 周处于三叶一心期水稻幼苗的第一片叶，置入放有湿润吸水纸的平皿中；
- (2) 每隔 1 cm 接种 5 μ L 孢子液，盖上平皿，置于湿度 90%，温度 28 $^{\circ}$ C 的光照培养箱中黑暗培养；
- (3) 24 h 后，12 h 光照/12 h 黑暗培养，观察叶片病斑长度（每个材料接种 3 个皿，每皿 10 片叶）。

白叶枯病抗性鉴定

◇ 水稻白叶枯病菌的培养

- (1) 取出于-80 $^{\circ}$ C 保存的菌株，于超净工作台上用灭菌枪头吸取菌液至土豆斜面培养基上，用灭菌接种环涂布均匀；
- (2) 置于 28 $^{\circ}$ C 温箱内培养 3 d，细菌长成亮黄色；
- (3) 第 2 次转接后的生根管置于 28 $^{\circ}$ C 温箱内培养 2 d，细菌长成亮黄色，可用于保存菌株或接种实验。

◇ 水稻白叶枯病的接种及调查方法

- (1) 菌体用 PBS 溶液稀释，采用比浊法将浓度稀释至约 9×10^9 个细菌/mL；
- (2) 接种采用剪叶法，于水稻孕穗期接种（也可于水稻幼苗期接种），接种时用剪刀蘸取菌液，剪去剑叶（幼苗期接种时选取完全伸展的叶片接种）叶尖约 2 cm 长部分，每个单株至少接种 5 片剑叶；
- (3) 在接种 20 d 测量病斑长度。

◇ 白叶枯病菌的细菌生长测定

取接种白叶枯病菌 3 d，6 d，9 d，12 d 的叶片，75%乙醇灭菌 30 min，2 mL 灭菌蒸馏水磨碎叶片，将菌液依次稀释为 100，101，102，103，104 和 105 这 6 个梯度涂于土豆培养基平板上，生长 3 d 后统计菌落数目，制作细菌生长曲线。

褐飞虱抗性鉴定

◇ 苗期抗性鉴定

将测试水稻材料浸种，催芽后均匀一致地播种在穴盘内，每个材料设 3 次重复，每重复 50 株，在秧苗 4 叶期时将 3 种水稻材料放在同一个带有尼龙网的养虫笼中，每株接褐飞虱 3 龄若虫 10 头，室内温度 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度 60%。接虫后每天记录水稻存活率和每 10 株水稻苗上褐飞虱数量，用来衡量 3 种水稻材料对褐飞虱的趋避性。

◇ 成株期褐飞虱抗性鉴定

将要鉴定的水稻播种在大田中，灌浆期时取健壮无虫的水稻植株移栽至小塑料桶中，每桶装同一个材料的两株水稻，设置 3 次重复。按每株 100 头接入 3 龄若虫褐飞虱，所以材料放在同一个温室中（温室内无其它水稻材料）。当材料间表现出差异时拍照。

◇ 刺吸电位技术记录褐飞虱取食行为

将羽化 24 h 内的雌虫饥饿饲水 2 h 后，用 CO_2 气流短时间麻醉，快速用导电银胶将一根细金线（长约 15~20 cm，直径 20 μm ）的一端与褐飞虱中胸背板粘合，金线的另一端与铜丝相连再连至昆虫电极。取洗净的水稻主茎，将其根部置于加有水的三角瓶中，用海绵塞将水稻茎固定在瓶口中央，在水中插入一段铜丝与植物电极相连。将粘好金线且已完全苏醒的褐飞虱轻轻放于上述稻株上，并将植株以 500 Hz，0.5 V 电流通电，开始记录取食波，连续记录 6 h，分析各种波行的持续时间等参数。每个材料记录 20 次以上波形，每次实验换新水稻苗和新褐飞虱。实验温度 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度 $65\%\pm 5\%$ 。

植物细胞壁成分分析

细胞壁多糖提取

✧ 磷酸buffer提取可溶性糖

称取 0.100 g 左右样品于研钵中，每份材料取 3 个重复。加入 1 mL pH 7.0 的 0.5 mol/L 磷酸缓冲液，研磨至匀浆后用磷酸缓冲液洗涤研钵和研棒，将匀浆转入 15 mL 离心管中，3000 g 离心 5 min（该方法下述离心速度和时间均相同），缓慢倒出上清。沉淀再用 5 mL 磷酸缓冲液洗 2 次，5 mL 蒸馏水洗 2 次，尽可能去除可溶性糖。

✧ 氯仿-甲醇去除脂类

沉淀中用移液管加入 5 mL 氯仿-甲醇（1: 1, v/v），室温（约 25 °C），150 r/min 振荡 1 h 后，离心，去上清。沉淀再用 5 mL 甲醇洗 1 次，再用 5 mL 丙酮洗 1 次，最后用 5 mL 蒸馏水洗 1 次，去掉上清。

✧ DMSO提取淀粉

于沉淀中加入 5 mL DMSO-H₂O（9: 1, v/v），室温振荡过夜（12 h），离心后，沉淀用 5 mL DMSO-H₂O 洗 2 次，再用 5 mL 蒸馏水洗 3 次。将上清液定容至 30.0 mL，蒸馏水透析 48 h（透析袋 8000-14000 Da）（每两小时换一次水）。收集所有透析后液体，100 mL 量筒中定容至 70.0 mL，取样，比色法测定戊糖、己糖。
注：样品在 DMSO 提取过后即为粗细胞壁材料（Crude cell wall）。

✧ 提取果胶质

草酸铵提取果胶质 1:

于沉淀中加入 5.0 mL 0.5%（w/v）草酸铵，在沸水中加热 1 h，在这期间每隔 10 min 摇匀，以免溶液表面的堆集。冷却后，3000 g 离心 5 min，收集上清液。沉淀再依次用 5 mL 0.5% 草酸铵洗 1 次，5 mL 蒸馏水洗 2 次，收集所有上清液，定容。比色法测定戊糖、己糖、糖醛酸。

0.1 mol/L KOH 提取果胶 2:

于沉淀中加入 5.0 mL 0.1 mol/L KOH（内含 1 mg/ml 的 NaHB₄），在 25°C 摇床

中 150 r/min 振荡 1 h。3000 g 离心 5 min, 收集上清液。沉淀再依次用 5.0 mL 0.1mol/L KOH 洗 1 次, 5 mL 蒸馏水洗 2 次, 收集所有上清液, 定容。比色法测定戊糖、己糖、糖醛酸。残渣待用。

◇ 4 mol/L KOH提取半纤维素

于沉淀中加入 5 mL 4 mol/L KOH (含 1 mg/mL NaHB₄), 室温 150 r/min 振荡 1 h 后, 离心, 沉淀再用 5 mL 4 mol/L KOH 洗 1 次, 5 mL 蒸馏水洗 2 次, 收集所有上清, 测己糖和戊糖。

注: 4mol/L KOH 需现用现配, 还原剂 NaHB₄ 应该在试剂使用前添加不宜过早, 注意密封保存; 样品经过此步骤处理后即为粗纤维素 (Crude cellulose)。

◇ 总纤维素、碱不溶半纤维素提取及测定

于 4 mol/L KOH 处理残渣(步骤 5 提取后材料)中加入 5.0 mL 67% (v/v) H₂SO₄, 混匀。25 °C, 150 r/min, 振荡 2 h 后, 用蒸馏水定容至 10.0 mL (终止水解反应), 冷却后, 3000 g 离心 5 min, 收集所有上清液, 取样, 测定己糖和戊糖含量。测定戊糖和己糖分别为碱不溶半纤维素和总纤维素含量。

◇ 晶体纤维素的提取与测定

称取水稻成熟期秸秆粉末 0.100 g 于 15 mL 离心管中, 加入 5.0 mL 乙酸/硝酸/水 (8: 1: 2, v/v/v) 溶液, 沸水浴 1 h, 每 10 min 摇匀 1 次。反应完后 3000 g 离心 5 min, 倒掉上清, 继续重复加入乙酸/硝酸/水 (8: 1: 2, v/v/v) 溶液, 沸水浴 1 h, 重复一遍。反应完后用蒸馏水洗至中性。加入 5.0 mL 67% (v/v) 浓硫酸, 于室温摇床 150 r/min 水解 2 h, 反应完后 3000 g 离心 5 min。离心后用蒸馏水定容至 10.0 mL 终止反应, 混匀再离心一次, 取 1.0 mL 离心后的上清液, 备用测糖。

◇ 半纤维素单糖组成测定

以上述草酸铵提取的残渣为基础:

- (1) 转移残渣到 5 mL 玻璃刻度试管中, 并定容到 2.5 mL;
- (2) 加入 2 mg/mL 肌醇 100.0 μL;
- (3) 加入 500 μL TFA, 并用生料带封口;
- (4) 盖上试管盖后于 120°C 水解 60 min;

- (5) 冷却后 4000 r/min 离心 5 min，取 500 μ L 上清液到新的玻璃试管中；
- (6) 减压干燥后用于乙酰化反应测定单糖组成。

比色法测戊糖、己糖和糖醛酸

✧ 戊糖含量测定

- (1) 取适量体积的样品于 10 mL 具塞玻璃试管中，加 dH₂O 补至总体积为 1.0 mL；
- (2) 加入 134.0 μ L A 试剂（6.00 g 苔黑酚溶于 100.0 mL 无水乙醇）；
- (3) 加入 2.0 mL B 试剂（0.100 g FeCl₃ 溶于 100.0 mL 浓盐酸中）快速摇匀；
- (4) 沸水中加热 20 min，自来水中冷却至室温；
- (5) 利用可见光分光光度计测定波长 660 nm 的吸光度；
- (6) 以木糖为标准品制作测定己糖含量的标准曲线：

取 1.00 mg/mL 木糖标准溶液 0.5 mL，1.0 mL，2.0 mL，3.0 mL，4.0 mL 于 100 mL 容量瓶中，加水定容，再分别取上述各溶液 1.0 mL 于 10 mL 具塞玻璃试管中，分别同步按照上述实验步骤测定波长 660 nm 的吸光度。

✧ 己糖含量测定

- (1) 取适量体积的样品于 10 mL 具塞玻璃试管中，加 dH₂O 补至总体积为 1.0 mL；
- (2) 冷水浴的条件下沿管壁缓慢加入 2.0 mL 0.20%（w/v）硫酸蒽酮试剂，快速摇匀；
- (3) 沸水中加热 5 min，自来水中冷却至室温；
- (4) 利用可见光分光光度计测定波长 620 nm 的吸光度；
- (5) 以葡萄糖为标准品制作测定己糖含量的标准曲线：

取 1.00 mg/mL 葡萄糖标准溶液 2.0 mL，4.0 mL，6.0 mL，8.0 mL，10.0 mL 于 100 mL 容量瓶中，加水定容，再分别取上述各溶液 1.0 mL 于 10 mL 具塞玻璃试管中，同步按照上述步骤测定波长 620 nm 的吸光度。

✧ 糖醛酸含量测定

- (1) 取适量体积的样品于 10 mL 具塞玻璃试管中，加 dH₂O 补至总体积为 1.0 mL；
- (2) 加入 5.0 mL 0.50%（w/v）四硼酸钠/硫酸溶液，充分摇匀；
- (3) 沸水中加热 5 min，自来水中冷却至室温；

- (4) 利用可见光分光光度计测定波长 520 nm 的吸光度 A，并回收样品；
- (5) 加入 100.0 μL 0.15% (w/v) 间羟基联苯溶液。充分混匀后，静置 10 min。
再次测定波长 520 nm 的吸光度 B；
- (6) 以半乳糖醛酸为标准品制作测定己糖含量的标准曲线：
取 1.00 mg/mL 半乳糖醛酸标准溶液 2.0 mL，4.0 mL，6.0 mL，8.0 mL，10.0 mL 于 100 mL 容量瓶中，加水定容，再分别取上述各溶液 1.0 mL 于 10 mL 具塞玻璃试管中，分别同步按照上述实验步骤两次测定波长 520 nm 的吸光度。

硅含量测定

碱氧法消化法快速测定水稻中的硅：

- (1) 称取过 80 目筛的谷壳样品 100 mg 左右，放于聚四氟乙烯坩埚中，加入次氯酸钠溶液（分析纯）6 mL 和 2.0 mol/L NaOH 溶液 2.0 mL。将坩埚置于 130°C 烘箱中，消化谷壳 30 min；
- (2) 取出坩埚，冷却后，溶液移至已盛有 9.0 mL 1.0 mol/L H_2SO_4 溶液及 100 mL 蒸馏水的 250 mL 容量瓶中，定容至刻度；
- (3) 定容后的试液 1.50 mL 移入 50 mL 容量瓶中，加入 1.0 mol/L H_2SO_4 溶液 2.00 mL，摇匀。5 min 后，加入 20 mL 蒸馏水，摇匀后加 5.0% 钼酸铵溶液 5.0 mL，摇匀。放置 10 min，再加 5.0 mL 5.0% 草酸溶液及 2.0 mL 0.5% 抗坏血酸，摇匀。20 min 后定容至刻度并在 810 nm 处比色测定。

标准曲线的制备

- (1) 称取二氧化硅（分析纯）27.97 mg 于镍坩埚中，加入氢氧化钠 3.59 g，加盖。在马弗炉中，400°C 下熔融 30 min，取出冷却后用蒸馏水溶解，再用 1 mol/L H_2SO_4 溶液调至中性，定容至 1000 mL。存于聚乙烯瓶中备用；
- (2) 分别取上述溶液（标准硅溶液）0.50，1.000，1.50，2.00，2.50，3.00，3.50，4.00 和 4.50 mL，进行比色测定，绘制标准曲线。

所需实验器材：聚四氟乙烯坩埚，镍坩埚，聚乙烯瓶，马弗炉（已有）

所需实验药品：次氯酸钠（分析纯），钼酸铵，抗坏血酸，草酸，二氧化硅（分析纯），硫酸，氢氧化钠

提取粗纤维素

- (1) 称量秸秆粉末 0.3 g，加入 10 mL 磷酸缓冲液（0.5 mol/L，pH 7.0），50°C，150 r/min 水平摇动 2 h；
- (2) 4000 r/min 离心 5 min，弃上清，沉淀加入 10 mL dH₂O 洗 3 次；
- (3) 加入 10 mL 氯仿/甲醇（1: 1，v/v），25°C，150 r/min 水平摇动 1 h；
- (4) 4000 r/min 离心 5 min，弃上清，沉淀用甲醇洗 1 次；
- (5) 加入 10.0 mL 4.0 mol/L KOH（含 1.0 mg/mL 的 NaHB₄），25°C，150 r/min 水平摇动 2 h；
- (6) 4000 r/min 离心 5 min，沉淀用 10.0 mL dH₂O 洗 5-6 次，直到 pH 成中性；
- (7) 加入 10.0 mL 8.0% NaClO₂（w/v，含 1.5% 乙酸），充分混匀后，25°C，150 r/min 水平摇动 48 h；每隔 12 h 更换一次新配的 8.0% NaClO₂（w/v，含 1.5% 乙酸）溶液；
- (8) 4000 r/min 离心 5 min，沉淀用 10.0 mL dH₂O 洗 8-10 次，直到 pH 成中性；
- (9) 真空干燥，即为粗纤维素粉末。

纤维素聚合度测定

◇ 粘度法测粗纤维素聚合度

- (1) 称取质量 W₁（约 0.05 g）的粗纤维素干粉于 15 mL 离心管中，用移液管准确加入 10.0 mL（V）1.0 mol/L 铜乙二胺溶液（Sigma, USA），25°C，150 r/min 避光水平摇动 12 h。同时取 10 mL 铜乙二胺溶液加入空离心管中作为对照；
- (2) 溶解好的纤维素铜乙二胺溶液及对照在 3000 g 离心 5 min。将离心管置于（25 ± 0.1）°C 精密玻璃水浴锅中，经过半小时的温度平衡后进行测定；
- (3) 测定时，先将待测溶液加入粘度计容器刻至刻度线处，然后夹住橡皮管，用洗耳球将溶液吸入粘度计毛细管上端的球体中；
- (4) 当液面达到球体上部小球一半液面时放开洗耳球，并松开橡皮管，待液面落至上部刻线的瞬时开始计时，至液面流出球体达到下部刻线时停表，记下流出时间（T）；

- (5) 按相同方法测定对照在同一粘度计中的流出时间 (T_0), 重复计时三次;
- (6) 测量完毕后将不溶的残渣有水三次, 然后用无水乙醇洗一次, 烘箱中烘干(过夜), 恒重后质量为 W_2 ;
- (7) 计算纤维素溶液的相对粘度 (η 相对): η 相对 = T/T_0 ;
- (8) 根据美国药典粘度表中 η 相对 $\sim [\eta] \cdot C$ 的关系, 查表得出 $[\eta] \cdot C$ 的值;
- (9) 根据溶解纤维素的重量 (W) 和铜乙二胺的体积 (V) 计算出浓度 (C): $C = (W_1 - W_2) / V$ 。 C 的单位为 $g/100 mL$;
- (10) 由步骤 8 和 9 的结果, 计算出特性粘度 $[\eta]$, 按照修正的公式: $DP = 190 \times [\eta]$ 计算出纤维素聚合度 DP 。

◇ 铜乙二胺溶液配置方法

- (1) 称取 100 g 分析纯硫酸铜, 放入盛有 800 mL 蒸馏水的 1 L 烧杯中, 加热至沸腾, (这步直接加入沸水就行);
- (2) 待硫酸铜全部溶解后, 在磁力搅拌器的搅拌下, 缓慢加入约 58 mL 浓氨水, 使硫酸溶液由最初的蓝色转变为翠绿色, 最后变为蓝色。继续搅 20 min 后静置, 使其沉淀;
- (3) 倾去上部清液, 用倾斜法反复洗涤沉淀。先用热蒸馏水洗 4 次, 再用冷蒸馏水洗若干次。在搅拌器的不断搅拌下加入约 400 mL 蒸馏水, 搅拌 10 min 后, 静置。当洗至用 10% 氯化钡溶液检验清液中无硫酸根离子时为止。最后加入足够的蒸馏水于沉淀物中, 使总体积为 600 mL, 置于冰箱中, 冷却至 10°C 以下;
- (4) 取出后, 不断搅拌, 并缓慢加入 340 mL 20% 的 NaOH 溶液 (预先冷却 NaOH 溶液), 再用倾斜法反复洗涤氢氧化铜沉淀, 至清液用酚酞检验无色时为止 (约 13 次);
- (5) 用足量的蒸馏水将氢氧化铜沉淀移入棕色细口瓶中, 使总体积 250 mL, 再加入无水乙二胺 40 g (含量 98% 的约加入 45 mL), 摇匀后, 静置 1-2 d。将上层清液缓缓转移另一棕色瓶中 (原棕色瓶中的黑色沉淀弃去), 备用。

纤维素还原端分析

- (1) 称量 0.010 g 粗纤维素，加入 100 mmol/L, pH 5.0 NaAC 缓冲液 1.0 mL;
- (2) 加入 0.5 U CBHI (Megazyme, USA), 50°C 的条件下反应一定的时间;
- (3) 12000 g 离心 10 min, 分离上清和沉淀;
- (4) 取 100.0 μ L 上清, 加入 400.0 μ L ddH₂O, 10.0 μ L 肌醇 (0.2 mg/mL), 100.0 μ L TFA;
- (5) 用聚四氟乙烯膜封口后, 120°C 水解 1 h;
- (6) 水解产物减压抽干后进行乙酰化反应, 并用 GCMS 定量分析单糖组成。

纤维素结晶度测定

使用广角 X-射线粉末衍射仪表征纤维素的结晶度。测试条件为: Cu 靶, K α 射线 ($\lambda = 0.15406$), 管压 40 kV, 管流 40 mA, 扫描速度为 10°/min, 步长为 0.02°, 发散狭缝 (DS): 1°, 接收狭缝 (RS): 0.3 mm, 防散射狭缝 (SS): 1°, 扫描范围 5-45°。纤维素的结晶度通过比较基线以上 $2\theta = 18^\circ$ (I_{am}) 处的最低峰高和 $2\theta = 22.5^\circ$ (I_{200}) 处的最强峰高, 来进行计算。

计算公式如下:

$$CrI \% = 100 \times (I_{200} - I_{am}) / I_{200}$$

木质素总量测定

- (1) 称取 0.30 g 秸秆样品 W1, 用滤纸包好, 放入索氏提取器中用苯-乙醇 (67:33, v/v) 抽提 4 h, 抽提后的粉末在通风橱中风干;
- (2) 解开滤纸, 将风干后材料完全转入 250 mL 三角瓶中, 加入 10.0 mL 67.0% (v/v) 硫酸, 放入摇床, 30°C 120 r/min 水平摇动 1.5 h;
- (3) 加入 200 mL dH₂O, 120°C, 水解 1 h;
- (4) 将水解液用 G3 坩埚式过滤器过滤, 充分将残渣转移到坩埚式过滤器中;
- (5) 滤液定容至 V = 250.0 mL, 取 1.0 mL 于玻璃比色管中, 用 2.88% (v/v) 硫酸稀释 10 倍 (视样品而定), 保证吸光度在 0.2-0.7 之间, 稀释倍数记为 D。

紫外分光光度计比色，测定 OD 值，光波长 205 nm，空白为 2.88% 的硫酸；
酸溶木质素的含量按照如下公式计算：

$$ASL\% = A \times D \times V / (1000 \times K \times W1) \times 100$$

A: 吸收值

D: 稀释倍数

V: 滤液的总体积

K: 酸溶木质素的吸收系数，取 110

W1: 样品质量

- (6) 将步骤 4 中坩埚式过滤器中残渣用 dH₂O 洗至 pH 中性；
- (7) 残渣和过滤器于 60°C 干燥至恒重，在干燥器中冷却至室温后，称重得 W2
(残渣+过滤器)；
- (8) 将称重后的过滤器和残渣放入马氏炉中，200°C 预热 30 min，然后 575 ± 25°C
灰化 4 h，取出后干燥器中冷却 30 min，称重得 W3 (灰分+过滤器)；
- (9) 酸不溶木质素的含量为：

$$AIL\% = (W2 - W3) \times 100 / W1$$

- (10) 样品总木质素的含量为：

$$\text{Lignin} (\%) = AIL (\%) + ASL (\%)$$

注：样品中灰分量为 (W3-W4) × 100 / W1，洁净干燥的坩埚质量为 W4；

木质素单体分析

- (1) **苯/乙醇抽提：**称取 0.100 g 秸秆粉末（过 40 目筛），用滤纸包好后放入含有苯/乙醇（67 : 33）溶液的索式提取仪中沸水抽提 6 h，取出，通风橱过夜风干至恒重，获得秸秆残留物（CWR）；
- (2) **硝基苯氧化反应：**称取 50.0 mg CWR 放入具有不锈钢保护层的聚四氟乙烯密封罐中（25 mL），并加入 5.0 mL 2.0 mol/L NaOH 溶液，0.50 mL 硝基苯和 1 个转子。将整套装置拧紧密封好后，置于 170°C 下反应 3.5 h，转速为 15 r/min。反应完毕后，将密封罐迅速冷却；
- (3) **加入内标：**将密封罐中反应混合液转移至 100 mL 磨口三角瓶中，密封罐用 2.0 mol/L NaOH 溶液冲洗干净。向三角瓶中加入一定量的内标物，内标物为

乙基香兰素（内标物的加入量依据不同的测定样品而定）；

- (4) **萃取：**用 30.0 mL 二氯甲烷/乙酸乙酯混合液（1 : 1/v）萃取反应混合液 3 次，目的是消除未反应完的硝基苯及其衍生物。保留水相。（此步保留萃取液上层，下层液体含有硝基苯衍生物）将水相用 6.0 mol/L 盐酸调 pH 值至 3-4 后（加约 5 吸管），充分摇匀。再次用 30.0 mL 二氯甲烷/乙酸乙酯混合液（1 : 1/v）萃取 3 次。此步保留萃取液下层；
- (5) **旋蒸：**收集有机相，旋蒸，得到固体残渣；
- (6) **上机样品制备：**将残渣用 5.0 mL 色谱纯的甲醇重新溶解后经 0.22 μm 滤膜过滤，取 20.0 μL 用 HPLC 检测；
- (7) 木质素单体 HPLC 检测条件：
柱子类型：universal C18 反相柱，4.6 mm × 250 mm。
流动相：甲醇/水/冰乙酸（25 : 74/v/v）。
流速：1.1 mL/min
检测波长：280 nm；温度：28℃。
进样量：20.0 μL

注意事项：

- (1) 样品抽提及裂解阶段，涉及到有毒试剂（苯、硝基苯），所以操作过程中需注意实验安全（检查密封性—索氏抽提器、四氟乙烯反应罐）；
- (2) 木质素单体内标浓度是 4 mg/mL（2.0 mol/L NaOH 配置）；
- (3) 裂解反应后，根据样品含木质素情况加不同体积的内标，通常是加 200 μL。萃取,旋蒸，最终用 5 mL 色谱甲醇溶解，因此上机时的内标浓度是 0.16 mg/mL。配标曲时的内标浓度按 0.16 mg/mL 配置；
- (4) 如气泡进入柱子，上机结束后，用 98% 色谱甲醇冲洗柱子，再用 20% 色谱甲醇封柱，将塞子塞紧。

标曲配制：

- (1) 配置 200 mL 内标，即称 32.0 mg 乙基香兰素溶于 200 mL 色谱甲醇中（0.16 mg/mL）；
- (2) 标准曲线的 5 个浓度分别是 0、100、200、500、1000 ug/mL。首先配置 1000 ug/mL 这个浓度 50 mL 作为母液，即分别称 H、G、S 单体 50.0 mg 放在同

一个容量瓶中用上一步配置的内标液 50 mL 溶解作为母液。随后用内标液再稀释配置其它浓度。

键连接分析

- (1) 苯/乙醇抽提：与木质素单体测定相同；
- (2) 提取酯键结合的酚类物质：称取 0.200 g CWR，加入 10 mL 1 mol/L 的 NaOH（含 1 mg/mL 亚硫酸氢钠），30°C，250 r/min 处理 18 h，离心，用等体积水洗三次（每次 10 mL），收集上清，再用 6 mol/L HCl 调 pH 至 2 左右，过滤（三层纱布）并用酸化水（pH 2.0）洗涤沉淀，过滤液用等体积氯仿萃取三次，收集下部有机相，低于 40°C 减压蒸馏至干，用 1 mL 流动相溶解，0.22 μm 滤膜过滤后 HPLC 进样；
- (3) 提取总结合（酯键+醚键）的酚类物质：称取 0.05 g 无抽出物的固体，加入 10 mL 4 mol/L NaOH（含 1 mg/mL 亚硫酸氢钠），170°C 处理 2 h，取出后用 5 mL 4 mol/L NaOH 洗涤一次至 15 mL，再用 6 mol/L HCl 调 pH 到 2 左右，过滤并用酸化水（pH 2.0）等体积洗涤沉淀，等体积氯仿萃取三次，收集下部有机相。低于 40°C 减压蒸馏完全，用 2.0 mL 流动相溶解，0.22 μm 滤膜过滤后 HPLC 进样；
- (4) HPLC 检测条件：与木质素单体测定相同。

乙酰化分析单糖含量

◇ 乙酰化反应流程

- (1) 减压抽干的样品，加入 800.0 μL dH₂O 震荡溶解；
- (2) 加入 0.40 mL 新配的 10.0% NaBH₄ 溶液（氨水配制），震荡混匀后于 40°C 水中保温 30 min，使糖完全还原为糖醇；
- (3) 慢速滴加 800.0 μL 冰醋酸（反应剧烈），终止反应；
- (4) 取 400.0 μL 上述还原液，加 600.0 μL 甲基咪唑和 4.0 mL 醋酸酐，在室温下乙酰化反应 10 min；
- (5) 加入 10.0 mL dH₂O 分解过量的醋酸酐，冷却至室温后；

20.0°C/min to 300°C 2.0 min

MS 条件:

接口温度: 250°C

离子源温度: 200°C

溶剂切除时间: 5 min

MS 检测器模式: 选择离子模式 (SIM)

各标准单糖和内标 IS 在 SIM 分析中, 保留时间与采集的荷质比如下:

	保留时间 (min)	目标离子 (m/z)	参考离子 (m/z)
Rha	20.380	128.0	115.0、170.0
Fuc	21.197	115.0	128.0、170.0
Ara	21.683	115.0	145.0、103.0
Xyl	23.670	115.0	145.0、103.0
IS	34.433	168.0	126.0、115.0
Man	34.820	145.0	115.0、139.0
Glc	35.173	145.0	115.0、139.0
Gal	35.460	115.0	145.0、139.0

硅烷化分析

- (1) 称取 0.010 g 样品 (透析并干燥后的果胶质), 加入 500 μL dH_2O 和一定量的肌醇作为内标;
- (2) 加入 100 μL TFA, 用生料带封口后盖上管盖, 120°C 水解 1 h;
- (3) 真空干燥;
- (4) 加入 100 μL 20 mg/mL 甲氧基氨基盐酸盐 (吡啶溶解), 充入氮气密封后涡旋;
- (5) 30°C 条件下反应 90 min;
- (6) 加入 100 μL N-甲基-N (三甲硅烷) -2, 2, 2 三氟乙酰胺 (N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide, MSTFA), 充入氮气密封后涡旋混匀;
- (7) 37°C 条件下反应 60 min;

- (8) 加入 800 μL 正己烷，用于 GC-MS 分析。

甲基化分析

- (1) 样品充分干燥；
- (2) 在氮气环境下，加入 200 μL 无水 DMSO，45 $^{\circ}\text{C}$ 溶解样品；
- (3) 加入干燥的 NaOH 粉末（约 25 mg），旋紧管盖，涡旋混匀，30 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 h，期间 1 h 涡旋一次；
- (4) 在氮气环境下，加入 200 μL 碘甲烷，旋紧管盖，涡旋混匀，30 $^{\circ}\text{C}$ 反应 12 h（过夜）；
- (5) 氮气吹干；
- (6) 加入 500 μL 氯仿，1 mL ddH₂O，涡旋萃取；
- (7) 收集下层有机相，并用 ddH₂O 洗三次，在 40 $^{\circ}\text{C}$ 干燥；
- (8) 加入 500 μL ddH₂O，100 μL TFA，120 $^{\circ}\text{C}$ 水解 1 h；
- (9) 真空干燥或 70 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干；
- (10) 加入 200 μL ddH₂O，100 μL NaBH₄，40 $^{\circ}\text{C}$ 还原反应 1 h；
- (11) 加入 200 μL 冰乙酸终止反应；
- (12) 取 200 μL 还原液，加入 600 μL 甲基咪唑，4 mL 乙酸酐，25 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min；
- (13) 加入 10 mL ddH₂O 终止反应；
- (14) 加入 3 mL 二氯甲烷，涡旋萃取；
- (15) ddH₂O 洗 3 次，保留下层有机相；
- (16) 加入适量无水硫酸钠，充分去除残留水分，有机相用于 GC-MS 分析。

2-AB 衍生化分析

- (1) 配置反应 MixA: 0.064 g 氰基硼氢化钠 + 0.041 g 2-氨基苯甲酰胺溶解于 700 μL DMSO 中；剧毒药品注意防护
- (2) 10 μg 寡糖样品中加入 50 μL 反应 Mix（700 μL 反应 MixA，加入 300 μL 的冰乙酸），37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 24 h；
- (3) 加入 85%（终浓度）甲醇，将样品蒸干；

- (4) 加入 500 μL ddH₂O,用稀氨水调 pH 到 10.0, 用 500 μL 氯仿抽提 8 次。保留水相;
- (5) 用稀醋酸中和上清至中性;
- (6) 上清脱盐: HyperSep C18 (1ML) 脱盐
 - ① 柱子预处理: 依次用 1 mL 甲醇、1 mL 用 HPLC 级 ddH₂O、1 mL 乙腈、1 mL 用 HPLC 级 ddH₂O 处理柱子;
 - ② 上样: 加入水相样品, 控制流速;
 - ③ 洗样: 用 1 mL HPLC 级 ddH₂O 洗一次;
 - ④ 洗脱: 用 1 mL HPLC 级 80% 乙腈/ddH₂O 冲洗柱子 2 次, 洗脱液备用。

GCMS 测定可溶性糖

- (1) 取样品 0.1 mL 于玻璃试管中, 加入 0.1 mL 内标肌醇 (2 mg/ml) 真空干燥;
- (2) 加入 N, O -双 (三甲基硅烷基) 三氟乙酰胺和 N, N -二甲基甲酰胺的混合液 (体积比 1: 1) 0.1 mL, 75°C 水浴加热 60 min;
- (3) 加入 1 mL 丙酮后 GCMS 分析。

GC-MS 条件:

载气: 氦气

进样口温度: 260°C

柱流速: 112 mL/min

进样量: 1 μL

分流比: 20: 1

升温程序: 起始温度 150°C, 4°C/min 升到 230°C, 20°C /min 升到 280°C, 保持 15 min

离子源: EI

气质接口温度: 280 °C

离子源温度: 230 °C

生物质降解效率分析

碱预处理及酶解

- (1) 称取秸秆粉末 0.300 g（每个处理 6 个重复）于 15 mL 离心管；
- (2) 其中 3 个加入 6 mL 的 dH₂O，50°C，150 r/min，2 h。3000 g 离心 5 min，3000 g 离心 5 min，取上清 1 mL，稀释一定倍数，测定戊糖、己糖。沉淀用 10 mL dH₂O 洗 5 次，去上清。（空白对照）；
- (3) 另外 3 个加入 6 mL 1%（w/v）的 NaOH 溶液，50°C，150 r/min，处理 2 h。3000 g 离心 5 min，取上清 1 mL，稀释一定倍数，测定戊糖、己糖。沉淀加入 10 mL 蒸馏水洗涤，3000 g 离心 5 min，去上清。重复 6 次，确保洗涤液至中性；
- (4) 上述残渣最后用 10 mL 0.2 mol/L pH 4.8 的醋酸缓冲液洗 1 次；
- (5) 碱处理样品加入 3 mL 3.2 g/L（或 4.0 g/L）纤维素复合酶溶液，用 0.2 mol/L pH 4.8 的醋酸缓冲液定容至 6 mL，最终酶浓度为 1.6 g/L（或 2.0 g/L）。放入摇床，150 r/min，50°C 酶解，48 h；
- (6) 3 个空白对照加入 0.2 mol/L pH 4.8 的醋酸缓冲液定容至 6 mL。放入摇床，150 r/min，50°C，48 h；
- (7) 将上述空白样品与碱处理样品 3000 g 离心 5 min，取上清 1 mL，稀释一定倍数，测定戊糖、己糖含量；
- (8) 酶解残渣使用 10.0 mL 蒸馏水洗涤 3 次，37 °C 烘干，用于材料显微结构的观察。

酸预处理及酶解

- (1) 称取秸秆粉末 0.300 g（每个处理 6 个重复）于 15 mL 离心管；
- (2) 其中 3 个加入 6 mL 的 dH₂O，50°C，150 r/min，2 h。3000 g 离心 5 min，取上清 1 mL，稀释一定倍数，测定戊糖、己糖。沉淀用 10 mL dH₂O 洗 5 次，去上清。（空白对照）；
- (3) 另外 3 个加入 6 mL 1%（v/v）的 H₂SO₄ 溶液，120°C 灭菌锅内处理 20 min。

- 处理结束后，取出冷却至 50 °C 左右。置于 50°C 摇床，150 r/min 震荡 2 h。
- 3000 g 离心 5 min，取上清 1 mL，稀释一定倍数，测定戊糖、己糖。沉淀加入 10 mL 蒸馏水洗涤，3000 g 离心 5 min，去上清。重复 6 次，确保洗涤液至中性；
- (4) 上述残渣最后用 10 mL 0.2 mol/L pH 4.8 的醋酸缓冲液洗 1 次；
 - (5) 加入 3 mL 3.2 g/L（或 4.0 g/L）纤维素复合酶溶液，用 0.2 mol/L pH 4.8 的醋酸缓冲液定容至 6 mL，最终酶浓度为 1.6 g/L（或 2.0 g/L）。放入摇床，150 r/min，50°C 酶解，48 h；
 - (6) 对照加入 0.2 mol/L pH 4.8 的醋酸缓冲液定容至 6 mL。放入摇床，150 r/min，50°C，48 h；
 - (7) 将上述空白样品与酸处理样品 3000 g 离心 5 min，取上清 1 mL，稀释一定倍数，测定戊糖、己糖；
 - (8) 酶解残渣使用 10.0 mL 蒸馏水洗涤 3 次，37 °C 烘干，用于材料显微结构的观察。

液体热水预处理及酶解

- (1) 称取秸秆粉末 0.300 g 于 25 mL 聚四氟乙烯罐中，加入 2.4 mL dH₂O，然后将聚四氟乙烯罐放入不锈钢反应釜中，最后放入油浴锅中加热。当导热油的温度达到设置温度（200°C）后，分别处理 8 min、16 min、32 min 和 64 min；
- (2) 处理完成后将样品冷却，然后加入适量 dH₂O 将样品转移至 15 mL 离心管，将样品 3000 g 离心 5 min，取预处理液 1 mL，稀释一定倍数，测定戊糖、己糖含量；
- (3) 将剩余上清液去掉，加入 10 mL 蒸馏水洗涤，3000 g 离心 5 min，倒掉上清。重复洗涤残渣 6 次，最后检查 pH，确保洗至中性；
- (4) 残渣最后用 10 mL 0.2 mol/L pH 4.8 的醋酸缓冲液洗 1 次，然后加入 3 mL 纤维素复合酶溶液，用 pH 4.8 的醋酸缓冲液定容至 6 mL，最终酶浓度为 2.0 g/L。放入摇床，150 r/min，50°C 酶解 48 h。酶解结束后将样品 3000 g 离心 5 min，取酶解液 1 mL，稀释一定倍数，测定戊糖、己糖含量；

CaO 预处理及酶解

- (1) 称取秸秆粉末 0.300 g 于 15 mL 离心管中，加入一定质量的 CaO 粉末 (CaO/样品 = 1%、5%、10%，w/w) 和 6 mL 水，50 °C，150 r/min，处理 2 h。每份样品 3 个重复；
- (2) 处理完成后将样品 3000 g 离心 5 min，取预处理液 1 mL，稀释一定倍数，测定戊糖、己糖含量；
- (3) 加入适量体积的 HCl 溶液，摇匀，50 °C，150 r/min 中和反应 2 h。3000 g 离心 5 min，倒掉上清；
- (4) 加入 10 mL 蒸馏水洗涤，3000 g 离心 5 min，倒掉上清。重复洗涤残渣 6 次，最后检查 pH，确保洗至中性；
- (5) 残渣最后用 10 mL 0.2 mol/L pH 4.8 的醋酸缓冲液洗 1 次，然后加入 3 mL 纤维素复合酶溶液，用 pH 4.8 的醋酸缓冲液定容至 6 mL，最终酶浓度为 1.6 g/L。放入摇床，150 r/min，50 °C 酶解 48 h。酶解结束后将样品 3000 g 离心 5 min，取酶解液 1 mL，稀释一定倍数，测定戊糖、己糖含量。

蒸汽爆破预处理

- (1) 将烘干的材料截成 5~8 cm 的小段，喷施蒸馏水使材料湿度达到 50% (即材料的湿重等于两倍的干重)；
- (2) 将截短喷湿后的材料装到容量为 5 L 的汽爆反应器中，225 °C (2.5 MPa) 处理 3 min。汽爆反应参数：2.5 MPa，3 min；
- (3) 收集处理后的残渣，风干，用小型粉样机将其粉碎，40 目过筛，50 °C 烘干至恒重，即获得汽爆后的实验材料。

表面活性剂的添加及酶解

将预处理后的生物质材料水洗至中性，再用 10 mL 0.2 mol/L pH 4.8 的醋酸缓冲液洗 1 次，接着加入 3 mL 3.2 g/L 或 4.0 g/L 的纤维素复合酶溶液，同时添加少量的准备好的高浓度的表面活性剂 (20% Tween-80, 10% PEG4000)，最后用 pH

4.8 的醋酸缓冲液定容至 6 mL，使得酶的终浓度为 1.6 g/L 或 2.0 g/L，Tween-80 的终浓度分别为 1%；PEG4000 的最终浓度分别为 0.5%。将离心管放入摇床，150 r/min，50°C 酶解 48 h。酶解反应结束后将样品 3000 g 离心 5 min，取酶解上清液 1 mL，稀释一定倍数，测定己糖、戊糖含量。

注：Tween-80 溶液先需要在热水中温浴 30 min，使其充分液化，再用移液管量取稀释，尽可能将移液管中残余的 Tween-80 完全溶解，稀释时宜用热水；PEG4000 则直接称取粉末，溶于单蒸水中进行配制。

生物质发酵产乙醇分析

乙醇发酵

◇ 分步糖化发酵

- (1) 生物质材料经过预处理后调 pH 至 4.8;
- (2) 加入终浓度为 1.6 g/L (或 2.0 g/L) 的纤维素酶 (磷酸缓冲液配置), 以及终浓度为 1% (v/v) 的吐温-80, 50°C, 150 r/min 酶解 48 h;
- (3) 120°C 灭菌 20 min;
- (4) 在无菌条件下, 加入适量的安琪耐高温酵母 (酵母终浓度为 0.5 g/L), 37°C 恒温厌氧条件下静置培养 48 h;
- (5) 发酵结束后, 用与发酵液等体积的 dH₂O 将发酵液转移到蒸馏烧瓶中;
- (6) 96°C 条件下蒸馏出与发酵液等体积的乙醇溶液, 用于测定乙醇含量。

◇ 半同步糖化发酵

- (1) 生物质材料经过预处理后调 pH 至 4.8;
- (2) 120°C 灭菌 20 min;
- (3) 在无菌的条件下, 加入终浓度为 1.6 g/L (或 2.0 g/L) 的纤维素酶 (灭菌的磷酸缓冲液配置), 以及终浓度为 1% (v/v) 的吐温-80, 50°C, 150r/min 酶解 48 h;
- (4) 在无菌条件下, 加入适量的安琪耐高温酵母 (酵母终浓度为 0.5 g/L, 无菌的磷酸缓冲液配置), 37°C 恒温厌氧条件下静置培养 48 h;
- (5) 发酵结束后, 用与发酵液等体积的 dH₂O 将发酵液转移到蒸馏烧瓶中。96°C 条件下蒸馏出与发酵液等体积的乙醇溶液, 用于测定乙醇含量。

乙醇含量测定

◇ 乙醇含量流程

- (1) 取 1.0 mL 样品 (蒸馏产物), 加入 2.0 mL 5% 重铬酸钾溶液, 震荡混匀后 100°C 水浴 10 min;

(2) 冷水中冷却，直接测定在波长 $\lambda = 600 \text{ nm}$ 下的吸光度。

◇ 标准曲线配置

- (1) 配置 20% (v/v) 乙醇溶液 (母液)，分别取 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0 mL 于 100 mL 容量瓶中定容到 100 mL。配得标曲的各个点浓度 (% v/v) 为 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.6;
- (2) 分别取上述标准溶液 1.0 mL 加入 2.0 mL 加入 2.0 mL 5% 重铬酸钾溶液，震荡混匀后 100°C 水浴 10 min。冷水中冷却，直接测定在波长 $\lambda = 600 \text{ nm}$ 下的吸光度。

细胞壁孔径分析

Simons' Stains 方法测定孔隙度

样品准备:

样品首先浸于 Milli-Q 蒸馏水过夜, 然后过 160 目尼龙筛, 再浸于甲醇过夜, 3000 g 离心, 用甲醇洗 2 次, 再浸于无水丙酮过夜, 3000 g 离心, 用丙酮洗 2 次, 然后在通风橱挥干过夜, 最后在 50 °C 烘箱干燥 2 h。

黄色染料 (DY) 准备:

DY 需要通过 100 KDa 超速离心膜 (ultracentrifugation membrane) 去掉低分子量组分。

- (1) 称取 0.1 g 干燥粉末于 15 mL 离心管中, 加入 1.0 mL 缓冲溶液 (5 mmol/L KAl(SO₄)₂ + 1.5 mmol/L NaCl);
- (2) 分别加入 0.25 mL、0.5 mL、0.75 mL、1.00 mL、1.50 mL 和 2.00 mL 浓度为 10 mg/mL 的 DB 和 DY 溶液 (1: 1 混合), 用双蒸水定容至 10.0 mL。形成不同的浓度梯度;
- (3) 置于摇床上 70 °C, 200 r/min 摇 9 h;
- (4) 8000 g 离心 5 min, 取上清在 612.5 nm (DY) 和 410.5 nm (DB) 波长下测定其吸光度。DB 和 DY 的初始浓度与上清液中的浓度之差即为材料吸附的染料的数量。

上清液中的浓度计算可按以下方程 (1) 和 (2) 进行, 总的吸附到生物质上的染料量可按方程 (3) 计算:

$$A_{410.5 \text{ nm}} = \varepsilon_{Y/410.5} LC_Y + \varepsilon_{B/410.5} LC_B \quad (1)$$

$$A_{612.5 \text{ nm}} = \varepsilon_{Y/612.5} LC_Y + \varepsilon_{B/612.5} LC_B \quad (2)$$

$$A_e = (C_i - C_e) \times V / (M \times 1000) \quad (3)$$

其中: A 是染料混合物在 410.5 nm or 612.5 nm 下的吸光度;

ε 是每种染料在对应波长下的吸光系数, $\varepsilon_{DY/410.5} = 31.83 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$,

$\varepsilon_{DB/410.5} = 3.418 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\varepsilon_{DY/612.5} = 0.143 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\varepsilon_{DB/612.5} = 23.96 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

L 为比色皿的宽度（本实验比色皿的宽度为1 cm）；

C_Y 、 C_B ：分别为溶液中黄色染料和蓝色染料的浓度；

A_e 是吸附到生物质上的总的染料量（mg/g）（包括 A_Y 和 A_B ）；

C_i 是两种染料的初始浓度（mg/L）；

C_e 是溶液中两种染料的浓度（mg/L）（包括 C_Y 和 C_B ）；

M 是生物质的质量（g）， V 是染料混合物的总体积（mL）。

利用 Langmuir 等温吸附模型计算最大吸附量。

刚果红染色测定纤维素孔隙度

- (1) 称取 0.1 g 干燥粉末于 15 mL 离心管中，加入 1.0 mL 磷酸缓冲溶液(0.3 mol/L Na_3PO_4 , 1.4 mmol/L NaCl, pH 6.8)；
- (2) 加入 0.25 mL、0.5 mL、0.75 mL、1.00 mL、1.50 mL 和 2.00 mL 浓度为 10 mg/mL 的刚果红溶液，用双蒸水定容至 10.0 mL。形成不同的浓度梯度；
- (3) 置于摇床上 60 °C，200 r/min 摇 24 h；
- (4) 8000 g 离心 5 min，取上清在 498 nm 波长下测定其吸光度。刚果红的初始浓度与上清液中的浓度之差即为材料吸附的染料的量。

$$A_e = (C_i - C_e) \times V / (M \times 1000)$$

A_e 是吸附到生物质上的刚果红的量（mg/g）；

C_i 是刚果红的初始浓度（mg/L）；

C_e 是吸附后溶液中刚果红的浓度（mg/L）；

M 是生物质的质量（g）， V 是染料混合物的总体积（mL）

利用 Langmuir 等温吸附模型计算最大吸附量。

纤维素酶吸附法

- (1) 称取 0.1 g 干燥粉末于 15 mL 离心管中；
- (2) 加入 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0 mg/mL 纤维素复合酶溶液 10 mL，形成浓度梯度；
- (3) 置于 4 °C 吸附反应 15 h，每 3 h 轻微混匀；

- (4) 3000 g 离心 15 min，取上清利用 Brandford 法测蛋白浓度；
- (5) 根据吸附前后蛋白浓度差，计算粉末吸附纤维素酶的量。
利用 Langmuir 等温吸附模型计算最大吸附量。

氮气法测定孔隙度

◇ 准备样品

- (1) 样品管洗净后烘干，用 dH₂O 冲洗 3 遍后用无水乙醇润洗一遍；
- (2) 待样品管烘干后，冷却至室温，称取空管质量并记录，空管可放在 250 mL 三角瓶里去皮后称重 W₁；
- (3) 称取 0.4000 g（预实验）样品，在长纸条上铺匀，缓慢平行，伸入至样品管最底部，样品总体积不能超过样品管下部球形体积的 2/3 即可；
- (4) 倒样，注意不要洒在侧壁或者外面；
- (5) 称取加入样品后和样品管的总质量 W₂ 并记录。

◇ 脱气开始

- (1) 黑色机箱 castle 长按开关，“嘀”声后绿灯亮起，一共有 3 个绿灯亮起，之前只要插上电源就有 2 个（风扇）绿灯亮；
- (2) 按下插座板 ON/OFF 键（开启真空泵），注意开泵之前，保证脱气口全部关闭，小针孔阀门全部关闭状态；
- (3) 脱气仪开关（右后方）打开；
- (4) 脱气仪面板旋钮全部旋转至“OFF”状态，即阀门全部关闭，白色细管拧紧，感觉拧不动即可；
- (5) 连接样品管。螺口打开，将螺帽套在样品管上端，套上黑色橡皮圈，样品管一直保持竖直，螺口慢慢拧上，拧至最紧；
- (6) 将样品管放至槽内，套上小护栏；
- (7) 设定加热温度（60 °C）（一般碳化的样品处理 200 °C，脱气 4-5 小时）；
- (8) 先打旋钮从“OFF”打至 → Gas ↓，即进入脱气状态；
- (9) 脱气阀拧开半圈，待真空指数升至 200-500 之间后（大概 5-10 min），再拧开半圈，等待指数升至 200-500 之间后，再开 2 圈，一般开 3 圈半左右。最

后待真空指数稳定在 200-500 之间后，就可以离开，一般植物样品低温脱气 12-15h 即可。

注意：如果样品不干，会观察到样品管侧壁上有水蒸气或者小水珠，注意上机前尽量将样品干燥完全，但是不能长时间高温干燥样品，会导致植物细胞结构组织孔隙坍塌遭到破坏，引起实验结果失败而测不出孔隙。

◇ 脱气关闭

- (1) 将套在样品管上的小护栏取出，将样品管取出放在靠外的一排槽孔内冷却，待冷却至室温；
- (2) 打开氮气阀，拧三圈打开；
- (3) 充氮气。将旋钮从“Vac”状态扭至“OFF”，马上扭至“Gas”状态，充气 10 sec 后，再将旋钮拧至“OFF”状态，充气完毕；
- (4) 拧开螺帽，塞上临时塞子（类似红色洗耳球下半截）；
- (5) 称样品管重量，拔开塞子后迅速称重，然后赶紧塞上塞子；
- (6) 可以将脱气泵关闭，即关闭插座按钮；
- (7) 计算好管内脱气后样品质量，即差值 $W=W_2$ （样品+样品管）- W_1 （样品管）；
- (8) 将样品管临时塞拔下，换上专用样品塞，样品塞旋转塞入样品管口。

注意：一般脱气后的样品质量会比之前称入样品管的质量少，因为脱气会将样品表面的水分子以及有机物质脱掉，减少了质量。一般 0.4000 g 样品脱气后在 0.3500g 左右。

◇ 上机操作



（一）安装样品管

- (1) 拆下主机上的密封小管，安装样品管，依次套上：保温套、螺帽、密封黑色；
- (2) 橡皮圈和盖子，拧紧；
- (3) 注意：样品管一定要竖直抵住，不能倾斜或者歪，不刮蹭侧壁，上管时握住最上方管口；
- (4) 测试压力小白细管在上样品管之前拧至一边，上好样品管后尽量靠近，拧紧；
- (5) 套上白色厚盖膜；
- (6) 杜瓦瓶（装液氮用）使用前用抹布擦干，里面不能有残留水或者水珠；（注

意：杜瓦瓶小心使用，轻拿轻放。)

- (7) 分装液氮至杜瓦瓶，液氮桶打开“L”阀门，出来液氮液体，待快满时用量尺测量液氮高度，液面高度在量尺最低端和小孔中间即可；
- (8) 提醒：分装液氮速度太慢，很耗时，建议充气前就开始分装液氮，另一人上机充气操作及后续安装样品管；
- (9) 将杜瓦瓶放至载物台，刚好卡在载物台内，瓶口对准样品管，套上保护黑色塑料罩，样品管上机操作完毕。



(二) 开机

- (1) 打开电脑，开软件桌面 2460 软件；
- (2) 打开真空泵（机械泵和分子泵），依次按开 2 个按钮，按“ 再按“”，待读数升至 100（很快）；
- (3) 开主机开关（主机左后方），打开 2 个气瓶总阀（氮气之前已经打开，打开氦气阀，拧 3-4 下）。

(三) 上机方法编辑

- (1) 桌面 2460 软件双击打开→File→New Sample→Replace All→data→BJH→Load→样品质量 Sample mass，样品命名→Save as→Load→data→Save；
- (2) D 盘→Micro→data→命名新文件夹；
- (3) 运行：Unit 1→Start High throughput→Browse→Start；
- (4) 观察运行状态：Show Analysis Status；
- (5) Pre---测量---Terminal，三个阶段，一共运行 3 h 左右；
- (6) 已经保存好之前的方法和文件夹，以后不需要再新建文件夹。保存数据，report 后选择保存 pdf 和 excel 两种格式。

(四) 关机

- (1) 关闭软件，按反顺序（安装）拆开主机样品罩、白色厚膜，将测试细管拧至一边，拆下样品管换上套管，注意小心操作；
- (2) 关闭主机，关闭氮气、氦气阀门，再依次按下“ ” → “”，待泵读数降为零后，再关闭黑箱主机；
- (3) **液氮回收**：打开液氮桶“gas”阀门，排气至跟大气压等压状态，注意不要站

在排气口，因为温度太低，打开“gas”总阀，拧开下面扣紧栓的旋钮，将阀门拿出来，直接将杜瓦瓶内液氮倒入至液氮桶里，倒完后按拆装反顺序安装好液氮桶。拿杜瓦瓶时带上棉手套，以免冻伤。

诱导产纤维素酶

孢子液的制备

- (1) 在土豆-葡萄糖培养基（PDA）上接种里氏木霉 Rut-C30 或草酸青霉 114-2 菌液，30°C培养 5-7 天（具体培养时间以菌株生长状况而定，以培养皿中布满孢子菌体为标准）；
- (2) 用 4-5 mL 灭菌水轻柔（防止孢子溅出）反复冲洗 PDA 培养基上里氏木霉 Rut-C30 孢子菌体，可以洗出里氏木霉的孢子；用含 2% Tween 80 的灭菌水轻柔反复冲洗 PDA 培养基中草酸青霉 114-2 孢子菌体，可以洗出草酸青霉的孢子；
- (3) 取 100 μL 步骤 2 中孢子液，用灭菌水（里氏木霉）或含 2% Tween 80（草酸青霉）的灭菌水稀释 M 倍（一般为 10 倍），准备镜检计数（一般备 2 个重复）；
- (4) 将步骤 3 中稀释好的孢子液混匀后滴加到血小球计数板上，显微镜观察计孢子数。计数时，取视野中大正方形中的 4 个边角和中间的共 5 个小正方形进行计数统计，求和得观察计数孢子数 N（重复计数，N 为多次计数平均值）。步骤 2 中孢子母液浓度 C 由以下公式计算的出：
$$C = N \cdot 4 / 5 / 16 \cdot M \cdot 10^6$$
C：孢子母液孢子浓度；N：计数平均数；M：孢子液稀释倍数；
- (5) 根据步骤 4 中计算的孢子母液浓度对孢子母液进行适当稀释，确保接种孢子液浓度为 10^7 mL^{-1} 。

秸秆材料诱导里氏木霉或草酸青霉产纤维素酶

- (1) 将预处理后的秸秆材料用产酶培养基转入到 100 mL 三角瓶中（原样材料则直接称量 0.600 g 至三角瓶中），定容，确保瓶中培养基体积为 30 mL；
- (2) 密封，115°C灭菌 30 min，冷却至室温，待接种；
- (3) 在超净工作台中向每个样品中加入 500 μL 上述已稀释好的孢子液；
- (4) 置于摇床中，30°C，200 r/min 培养 7 d；

- (5) 将培养液转移到 50 mL 离心管中 3000 g 离心 5 min，收集上清，-20°C 保存待用。

诱导酶液活性测定

◇ 滤纸酶活测定步骤

- (1) 将 Whatman No. 1 滤纸剪成 1 cm × 6 cm (50 mg) 大小的长方形纸条，圈成纸卷置于 15 mL 离心管中；
- (2) 将待测的酶液稀释到适当的浓度，取稀释的酶液 1 mL 加入到装有滤纸的离心管中，加 3 mL pH 4.8 柠檬酸缓冲液 (0.05 mol/L)，50°C，150 r/min 酶解 1 h (酶液的稀释要确保最终的酶解滤纸产糖在 1.9-2.1 mg 之间，原则上应为 2 mg)；
- (3) 酶解反应结束后，沸水浴 10 min 杀灭酶活性。冷却至室温后，3000 g 离心 5 min；
- (4) 取上清，DNS 法测定酶解液中还原性糖含量。

◇ DNS 法测定还原性糖含量

- (1) 液稀释到适当的浓度 (样品测定比色读数在 0.2-0.8 之间)；
- (2) 取稀释后的酶解液 1 mL 置于 10 mL 的具塞玻璃试管中，加入 2 mL DNS 试剂，混匀，沸水浴 5 min，冷水迅速冷却；
- (3) 反应混合液冷却后，于可见光波长 540 nm 测吸光度，以 1 mL 蒸馏水作空白对照。

注：1 min 水解底物产生 1 μmol 葡萄糖所需的酶量定义为 1 个滤纸酶活力单位 (FPU)。

滤纸酶活力 (U/mL) = (葡萄糖含量 (mg/mL) × 酶解体系 (mL) × 5.56 × 稀释倍数) / (反应液中酶液加入量 (mL) / 时间 (min))

式中：5.56 为 1 mg 葡萄糖的 μmol 数。(1000/180 = 5.56)

制作以葡萄糖为标准样品的还原糖标准曲线

准确配制 1.0 mg/mL 葡萄糖标准溶液母液。移液管分别量取 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0 mL 于 100.0 mL 容量瓶中，加水定容。此时，葡萄糖标准溶液的

浓度梯度为：0.1，0.2，0.3，0.4，0.5 mg/mL。分别取上述各溶液 1.0 mL 于 10.0 mL 具塞玻璃试管中（1.0 mL 蒸馏水作空白对照）。加入 2.0 mL DNS 溶液，快速摇匀。在沸水中加热 5 min，取出冷却，540 nm 波长比色，读取吸光值。根据标准溶液浓度与吸光值读数，计算得到葡萄糖标准曲线。

备注：

DNS 试剂：称取 3,5 二硝基水杨酸 6.3 g 与 50 mL 大烧杯中，用少量蒸馏水溶解后加入 NaOH 溶液（NaOH 21 g），再加入到 500 mL 含有 185 g 酒石酸钾钠的热水中，再加苯酚 5 g，无水亚硫酸钠 5 g，搅拌至溶解，冷却后用蒸馏水定容至 1000 mL，贮藏于棕色瓶中备用，室温放置 7 天后使用。（注意：3,5 二硝基水杨酸与氢氧化钠的加入时间一定要很近，或者是先加入氢氧化钠，否则会产生难容的沉淀，导致配制溶液失败，且配制过程中，溶液加热温度不宜超过 50°C）

pH 4.8 柠檬酸钠缓冲液（0.05 mol/L citrate buffer pH 4.8）：称取一水柠檬酸 210 g，再加蒸馏水 750 mL 溶解，然后加氢氧化钠（直到 pH = 4.3）50-60 g，最后定容至 1000 mL。

酵母遗传操作

酿酒酵母感受态细胞的制备及转化

- (1) 第一日中午 12 点（视酵母宿主菌培养至对数期所需时间不同，可自行安排接种时间），在超净工作台上接种酵母于 10 mL $2 \times$ YPD 培养基中， 28°C ，200 r/min，摇瓶培养过夜。同时将一个装有 50 mL $2 \times$ YPD 培养基的 250 mL 三角瓶放入摇床预热过夜；
- (2) 第二日上午 8 点，在超净工作台取昨日摇酵母 100 μL 于 1.5 mL 离心管中，摇瓶继续摇；
- (3) 取 900 μL ddH₂O 于上述 1.5 mL 离心管中，稀释 10 倍。吸取 10 μL 于显微镜下 40 倍血球计数，数出 5 个 4×4 格子中酵母总数（由于酵母是出芽生殖，所以几个酵母出芽在一起的算一个），总数计算：例如， $239 \text{ cells} \times 5 \times 10$ （稀释倍数） $\times 10,000 = 1.2 \times 10^8$ ；
- (4) 吸取 2.5×10^8 cells（即上述酵母培养液 2 mL 左右）于已经预热的装有 50 mL $2 \times$ YPD 培养基的 250 mL 三角瓶中，使此时细胞浓度应为 5×10^6 cells/mL，将三角瓶置于摇床 28°C ，200 r/min 摇瓶扩大培养 3~5 h，使酵母细胞分裂 3~4 次；
- (5) 再血球计数细胞浓度，当至少达到 2×10^7 cells/mL 时，收集所有细胞， 4°C ，4,000 r/min，离心 5 min，弃上清，用灭菌的 ddH₂O 洗去细胞表面培养基两次，最后用 1 mL 预冷 ddH₂O 重悬细胞（如果扩大培养的细胞浓度大于 5×10^6 cells/mL，则适当增加重悬细胞的 ddH₂O 的体积；如果低于，则减少体积）；
- (6) 将上述 1 mL 细胞转移至 1 个灭菌 1.5 mL Eppendorf 离心管中，13,000 r/min 离心 30 s 后弃上清，然后再加 ddH₂O 至终体积为 1 mL，轻轻用枪头重悬细胞；
- (7) 将上述细胞分装至 1.5 mL 离心管中，每管 100 μL （ 10^8 个细胞），再 13,000 r/min 离心 30 s，弃上清；
- (8) 取一管感受态细胞（100 μL ），加入转化混合液（现配现用，不断混匀后置于冰上），并用旋转仪混匀（注意：平时所用质粒浓度大致为 $0.02\sim 0.05 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，

34 μL 大致为 0.68 μL 左右，所以质粒不需要稀释，按平时所提质粒浓度即可；反复冻融 3~5 次后的 Carrier DNA 需再煮沸 5 min，置于冰上备用）；

试剂	转化所用管数与试剂量 (μL)		
	1	5 (6 \times)	10 (11 \times)
PEG3350 50% (W/V)	240	1440	2640
LiAc (1.0 mol/L)	36	216	396
Boiled SS-carrier DNA (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	50	300	550
Plasmid DNA (0.1 to 1 μg) plus water	34	60	374
Total	360	2160	3960

- (9) 将上述转化管置于 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴热激 0.5~1 h (时间视酵母菌株的不同有差异)；
- (10) 热激后 6,000~8,000 r/min 离心 30 s, 用枪吸走混合转化液, 加入 1 mL 2 \times YPD 培养基重悬细胞；
- (11) 涂平板：对于需要整合的质粒，1 mL 菌液离心后直接涂平板，200 μL /平板；对于游离的质粒，需要取出 10 μL 菌液至 990 μL ddH₂O 中稀释 100 倍，再涂平板，100 μL /平板，另外再吸取 10 μL 于 90 μL ddH₂O 中混匀，100 μL 的 1,000 倍稀释菌再全部涂板；
- (12) 28 $^{\circ}\text{C}$ ，倒置培养 2~3 d。

酿酒酵母基因组 DNA 提取

- (1) 挑取酵母单菌落接种于 5 mL 液体 YPD 培养基中，28 $^{\circ}\text{C}$ ，200 r/min，摇床振荡培养 24 h；
- (2) 取 2 mL 菌液，8,000 r/min，离心 5 min，收集菌体；
- (3) 用 ddH₂O 重悬菌体，洗涤 2 次，8,000 r/min 离心 5 min，弃上清；
- (4) 用 400 μL TE 缓冲液重悬菌体，再加入 30 μL 10% SDS 和 10 μL 20 mg/mL 蛋白酶 K，充分摇匀后，50~55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h，其间每隔 5 min 颠倒混匀；
- (5) 水浴 1 h 后取出，再加入 180 μL 5 mol/L 乙酸钠，冰浴 10 min；
- (6) 12,000 r/min 离心 5 min，吸上清于另一离心管；
- (7) 加入等体积的酚/氯仿 (Tris 饱和酚配制)，反复抽提 2 次；

- (8) 再加入等体积的氯仿抽提 1 次，以除掉酚；
- (9) 吸取上清，加入 2 倍体积预冷无水乙醇，-20℃静置 20 min；
- (10) 12,000 r/min 离心 5 min，沉淀 DNA；
- (11) 用 75% 乙醇洗涤 DNA 沉淀 2 次；
- (12) 吹干 DNA，最后用 30~50 μL ddH₂O 溶解 DNA。

重金属操作

吸附实验

吸附实验中所用试剂皆为优级纯 ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 HCl 、 NaOH 、 HNO_3)，水为超纯水。最佳吸附条件 pH、 Cd^{2+} 初始浓度、吸附剂投加量、反应温度、吸附时间的选定均以油菜材料为例，根据各个材料确定其最佳吸附条件。

◇ 吸附影响因素--pH

- (1) 取 10.0 mL 100.0 mg/L Cd^{2+} 溶液于 500 mL 容量瓶中超纯水定容。将配置好的溶液转至烧杯中，用 pH 计分别调节 pH 至 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0。调节 pH = 4.0、5.0、6.0 时，使用 pH = 4.00 和 pH = 6.86 的标准液校准，调节 pH = 7.0、8.0 时，使用 pH = 6.86 和 pH = 9.18 的标准液校准；
- (2) 将配好的各 pH 值的 Cd^{2+} 溶液取 25.0 mL Cd^{2+} 溶液至 50 mL 离心管中，做好标记；
- (3) 称取 0.0250 g 吸附剂（发酵残渣和原料，吸附剂为 1.0 g/L）加入分装好 Cd^{2+} 的离心管，每个样品三个重复，150 r/min，25°C，4 h；
- (4) 将吸附结束的样品，3000 g 离心 5 min，收集部分上清液，稀释一定倍数，加入适量浓硝酸（10 mL 上清中加入 50 μL 浓硝酸，以减少 Cd^{2+} 沉淀，确保测试准确），用火焰原子吸收分光光度计测定吸附后上清的 Cd^{2+} 浓度；
- (5) 根据吸附效果确定材料最佳吸附 pH。

◇ 吸附影响因素-- Cd^{2+} 初始浓度

- (1) 取 100.0 mg/L Cd^{2+} 溶液，分别稀释至 Cd^{2+} 浓度为 2.0、5.0、10.0、15.0、20.0、30.0、40.0 mg/L，调节 pH 至 6.0（根据实验结果选定材料最佳吸附条件）；
- (2) 将配好的不同浓度的 Cd^{2+} 溶液取 25.0 mL Cd^{2+} 溶液至 50 mL 离心管中，做好标记；
- (3) 称取 0.0250 g 吸附剂（发酵残渣和原料，吸附剂为 1.0 g/L）加入分装好 Cd^{2+} 的离心管，每个样品三个重复，150 r/min，25°C，4 h；
- (4) 将吸附结束的样品，3000 g 离心 5 min，收集部分上清液，稀释一定倍数，

加入适量浓硝酸（10 mL 上清中加入 50 μL 浓硝酸），用火焰原子吸收分光光度计测定吸附后上清的 Cd^{2+} 浓度；

(5) 根据吸附效果确定材料最佳吸附 Cd^{2+} 初始浓度。

◇ 吸附影响因素—吸附剂投加量

- (1) 取 100.0 mg/L Cd^{2+} 溶液，稀释至 Cd^{2+} 浓度为 10.0 mg/L，调节 pH 至最佳 pH；
- (2) 将调节好 pH 的 Cd^{2+} 溶液取 25.0 mL 至 50 mL 离心管中，做好标记；
- (3) 分别称取 0.0050 g、0.0150 g、0.0250 g、0.0350 g、0.0450 g 吸附剂（发酵残渣和原料，吸附剂分别为 0.2, 0.6, 1.0, 1.4, 1.8 g/L），每个样品三个重复，150 r/min，25 $^{\circ}\text{C}$ ，4 h；
- (4) 将吸附结束的样品，3000 g 离心 5 min，收集部分上清液，稀释一定倍数，加入适量浓硝酸（10 mL 上清中加入 50 μL 浓硝酸），用火焰原子吸收分光光度计测定吸附后上清的 Cd^{2+} 浓度；
- (5) 根据吸附效果确定材料最佳吸附剂投加量。

◇ 吸附影响因素—反应温度

- (1) 取 100.0 mg/L Cd^{2+} 溶液，稀释至 Cd^{2+} 浓度为 10.0 mg/L，调节 pH 至 6.0；
- (2) 将调节好 pH 的 Cd^{2+} 溶液取 25.0 mL 至 50 mL 离心管中，做好标记；
- (3) 称取 0.0250 g 吸附剂（发酵残渣和原料，吸附剂为 1 g/L）加入分装好 Cd^{2+} 的离心管，每个样品三个重复，分别在 15、25、35、45 $^{\circ}\text{C}$ 下，150 r/min，4 h；
- (4) 将吸附结束的样品，3000 g 离心 5 min，收集部分上清液，稀释一定倍数，加入适量浓硝酸（10 mL 上清中加入 50 μL 浓硝酸），用火焰原子吸收分光光度计测定吸附后上清的 Cd^{2+} 浓度；
- (5) 根据吸附效果确定材料最佳反应温度。

◇ 吸附影响因素—吸附时间

- (1) 取 100.0 mg/L Cd^{2+} 浓液，稀释至 Cd^{2+} 浓度为 10.0 mg/L，调节 pH 至 6.0；
- (2) 将调节好 pH 的 Cd^{2+} 溶液取 25.0 mL 至 50 mL 离心管中，做好标记；
- (3) 称取 0.0250 g 吸附剂（发酵残渣和原料，吸附剂为 1 g/L）加入分装好 Cd^{2+} 的离心管，25 $^{\circ}\text{C}$ ，150 rpm，9 个相同条件的重复，分别在 1、5、10、20、

30、60、120、180、240 min, 用 0.45 μm 滤膜过滤取上清;

(4) 过滤所得溶液, 稀释一定倍数, 加入适量浓硝酸(10 mL 上清中加入 50 μL 浓硝酸), 用火焰原子吸收分光光度计测定吸附后上清的 Cd²⁺浓度;

(5) 根据吸附效果确定材料最佳吸附时间。

◇ 等电点测定

(1) 配置 0.1 mol/L NaCl 溶液;

(2) 用 HCl 或 NaOH 将配置好的 NaCl 溶液分别调节 pH 至 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0;

(3) 将各 pH 值 NaCl 溶液取 40.0 mL 至 50 mL 离心管;

(4) 称取各吸附剂 0.0800 g (1.0 g/L) 加入离心管;

(5) 150 r/min, 25°C, 振荡 48 h, 48 h 后静置, 测平衡后 pH。

◇ 红外光谱 (FTIR) 分析

采用美国 Thermo scientific Nicolet iS50 傅立叶红外光谱仪分析, 样品过 160 目筛, 将溴化钾和样品提前烘干备用。溴化钾压片, 由于植物秸秆粉末成分复杂, 为避免图谱未出峰, 需在 KBr: 样品=50: 1 的基础上多加些样品, 充分研磨均匀后压片, 片子厚度适宜, 均匀, 在 4000-400 cm⁻¹ 范围进行扫描。先扫空白 (KBr 片子), 采集背景。点击样品采集, 待将样品的片子放好后, 再点确认, 采集完成, 数据分析依次是吸光度、自动基线校正、透射比 T。最后删除其他线, 留下透射线, 保存数据。通过特征峰鉴定并定性分析样品中的化学基团。

◇ 等温吸附模型

利用 Langmuir 和 Freundlich 模型, 对吸附实验数据进行拟合。

$$\text{Langmuir 线性方程: } \frac{C_e}{q_e} = \frac{C_e}{q_{max}} + \frac{1}{bq_{max}} \quad (2-1)$$

q_e 是平衡吸附金属量 (mg/g), q_{max} 是单层最大吸附容量 (mg/g), b 是平衡吸附常数 (L/mg), 其与吸附剂吸附能力有关, 大小反应了吸附剂与金属离子之间的结合力, C_e 是吸附平衡时金属离子溶液浓度 (mg/L)。

$$\text{Freundlich 线性方程: } \ln q_e = \ln K_F + \frac{1}{n} \ln C_e \quad (2-2)$$

其中 q_e 是平衡吸附金属量 (mg/g), C_e 是吸附平衡时金属离子溶液浓度, K_F (L/g) 和 n 是 Freundlich 常数。 K_F 与吸附量有关, n 与吸附强弱有关。

◇ 准二级动力学模型

准二级动力学方程表达式为:
$$\frac{dq_t}{dt} = k_2 (q_e - q_t)^2 \quad (2-3)$$

对式 (2-3) 进行积分, 由边界条件 $t=0$ 时, $q_t=0$; $t=t$ 时, $q_t=q_t$, 可得

$$\frac{1}{q_e - q_t} = \frac{1}{q_e} + k_2 t \quad (2-4)$$

式中 k_2 为准二级动力学吸附速率常数 (g/min·mg), q_e 是平衡吸附金属量 (mg/g), q_t 为 t 时刻吸附剂的吸附量 (mg/g)。对式 (2-4) 变形可得:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e} \quad (2-5)$$

溶液中镉含量的测定

采用日立 Z-2000 火焰原子吸收分光光度计测定溶液中镉的含量。先测定标曲溶液, 绘制标曲, 再依次测定样品溶液的镉含量。

标准曲线的制作

配制 10 mg/L Cd^{2+} 溶液: 取 5.0 mL 的 100 mg/L Cd^{2+} 溶液于 50 mL 容量瓶, 加 0.5 mL 的优级纯硝酸后用超纯水定容。分别取 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 的 10 mg/L Cd^{2+} 溶液于 50 mL 容量瓶并用超纯水定容, 得到浓度分别为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/L 的 Cd^{2+} 溶液。用火焰原子吸收分光光度计测定各溶液的吸光度, 制作标曲。

计算方法

溶液中的镉含量 = 标曲 × 稀释倍数

$$\text{Absorption rate (\%)} = (C_0 - C_1) \times 100 / C_0$$

$$q_e \text{ (mg/g)} = (C_0 - C_1) \times V / W$$

注: Absorption rate (%) 为吸附效率, q_e (mg/g) 为吸附量, C_0 为溶液中初始镉含量 (mg/L), C_1 为吸附后溶液中剩余镉含量 (mg/L), V 为吸附体系 (L),

W 为吸附剂投加量 (g)。

秸秆中镉含量测定

干法灰化: 称取 0.1-0.3 g 干试样(精确至 0.001g)于瓷坩埚中, 移入马弗炉 200℃ 0.5-1 h, 然后 600℃ 灰化 7 h, 直至试样消化完全, 呈灰白色或浅灰色。放冷, 用 1% 硝酸溶液将灰分溶解, 将试样消化液移入 10 mL 或 25 mL 容量瓶中, 用少量 1% 硝酸溶液洗涤瓷坩埚 3 次, 洗液合并于容量瓶中并用 1% 硝酸溶液定容至刻度, 混匀备用; 同时做试剂空白试验。上机检测。

仪器: 石墨炉原子吸收分光光度计 (Agilent 240Z GF)