

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102166367 A

(43) 申请公布日 2011. 08. 31

(21) 申请号 201010617136. 9

A61L 101/36(2006. 01)

(22) 申请日 2010. 12. 30

A61L 101/32(2006. 01)

A61L 101/48(2006. 01)

(71) 申请人 西北农林科技大学

地址 712100 陕西省西安市杨凌示范区邠城路3号(林学院)

(72) 发明人 唐明 孙学广 陈辉

(74) 专利代理机构 西安集思得知识产权代理有限公司 61210

代理人 张晋吉

(51) Int. Cl.

A61L 2/18(2006. 01)

A01N 47/44(2006. 01)

A01P 1/00(2006. 01)

A01N 37/20(2006. 01)

A01N 43/16(2006. 01)

A01N 43/80(2006. 01)

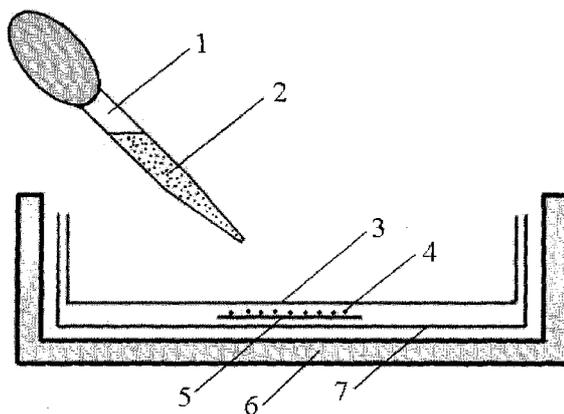
权利要求书 1 页 说明书 2 页 附图 1 页

(54) 发明名称

丛枝菌根真菌孢子的表面消毒方法

(57) 摘要

本发明公开了一种丛枝菌根真菌孢子的表面消毒方法,其技术方案是将滤纸与吸水纸分别放入几个培养皿内,配制孢子表面消毒液,将载有 AMF 孢子的滤纸片放入培养皿内的双层滤纸中间,吸取消毒液滴加在上层滤纸上,将双层滤纸转移到装有吸水纸的培养皿中,用吸水纸吸取所吸附的消毒液,取出上层滤纸并倒置放入另一培养皿中,转移滤纸上的 AMF 孢子,完成表面消毒。本发明通过双层滤纸和培养皿的组合实现了对 AMF 孢子的表面消毒。该方法操作简单温和,消毒液用量少,消毒前后不会丢失孢子,也不影响孢子的活力,同时也不需要其他仪器的辅助。



1. 丛枝菌根真菌孢子的表面消毒方法,其特征在于:是通过以下技术方法实现的:

1. a. 取两张滤纸将其边缘上折后铺入其中一个培养皿内,裁剪一些吸水纸放入其它几个培养皿内,另留二个空培养皿不放滤纸与吸水纸,将培养皿包严,备用蒸馏水,对培养皿和蒸馏水进行高压蒸汽灭菌;

1. b. 配制含有氯胺 T、氯霉素、硫酸庆大霉素、硫酸链霉素和吐温 -20 共 5 种试剂的孢子表面消毒液,将消毒液通过微孔滤膜过滤除菌;

1. c. 打开装有双层滤纸的培养皿,将载有 AMF 孢子的滤纸片放入培养皿内的双层滤纸中间,用胶头滴管吸取消毒液滴加在上层滤纸上,使整个双层滤纸浸透并在上层可见消毒液,将培养皿封盖;

1. d. 消毒过程中如需更换消毒液,可通过转移双层滤纸至装有吸水纸的培养皿内吸取消毒液,再转至另一套空培养皿中重新添加消毒液;

1. e. 在消毒完成后,将双层滤纸转移到装有吸水纸的培养皿中,用吸水纸吸取双层滤纸所吸附的消毒液;

1. f. 转移双层滤纸至装有吸水纸的另一培养皿中,用胶头滴管在上层滤纸中添加无菌水,利用吸水纸吸取水分,重复操作 3-5 次;

1. g. 取出上层滤纸并倒置放入另一培养皿中,解剖镜下分别检查并转移上层滤纸、下层滤纸和滤纸片上的 AMF 孢子,AMF 孢子的表面消毒完成。

2. 根据权利要求 1 所述的丛枝菌根真菌孢子的表面消毒方法,其特征在于:是通过以下技术方法实现的:

2. a. 备用 10 套 60mm 的玻璃培养皿、直径为 75mm 的普通滤纸和吸水纸,取两张滤纸将其边缘上折后铺入培养皿底,其上折的边缘与培养皿壁留有空隙以便转移,裁剪一些吸水纸,大小刚好放入培养皿底,4 张一组放入培养皿内,共放置 7 套培养皿,另留二套空培养皿以备转移双层滤纸,将培养皿包严,备用 200ml 蒸馏水和 2 支胶头滴管,对培养皿、蒸馏水和胶头滴管在 121°C 下高压蒸汽灭菌 20min;

2. b. 配制含有 50g/L 氯胺 T、50mg/L 氯霉素、100mg/L 硫酸庆大霉素、200mg/L 硫酸链霉素和 0.05% 吐温 -20 的孢子表面消毒液 20mL,将消毒液通过 0.22  $\mu$ m 孔径的微孔滤膜过滤除菌;

2. c. 整个孢子表面消毒过程在室温条件下,放置于超净工作台上进行,打开装有双层滤纸的培养皿,将载有孢子的滤纸片放入培养皿内的两层滤纸正中,用胶头滴管吸取消毒液从一侧开始滴加在双层滤纸的上层滤纸上,使整个双层滤纸浸透并在上层可见消毒液,封盖培养皿,消毒液滴加过程中避免产生气泡;

2. d. 消毒过程中如需更换消毒液,可通过转移双层滤纸至装有吸水纸的培养皿内吸走消毒液,再转至另一套空培养皿中重新添加消毒液来实现;

2. e. 消毒时间为 15min,消毒完成后,将双层滤纸转移到装有吸水纸的培养皿中,用吸水纸吸取滤纸吸附的消毒液;

2. f. 转移双层滤纸至装有吸水纸的另一培养皿中,用另一个胶头滴管在上层滤纸表面添加无菌水,利用吸水纸从下层滤纸吸收水分,重复操作 5 次;

2. g. 取出上层滤纸并倒置放入另一套培养皿内,解剖镜下分别检查并转移上层滤纸、下层滤纸及滤纸片上的 AMF 孢子,AMF 孢子的表面消毒完成。

## 丛枝菌根真菌孢子的表面消毒方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种表面消毒方法,具体是一种丛枝菌根真菌孢子的表面消毒方法,属于微生物培养领域。

### 背景技术

[0002] 丛枝菌根真菌 (AMF) 是一类不能纯培养的植物共生菌,在对 AMF 非共生阶段及生理生化的研究中往往需要对其孢子进行表面消毒以排除其他微生物的干扰。由于 AMF 的孢子具有贴壁的特性,在一般的器具中它们往往贴伏在器壁上,很难使其完全浸没在消毒液中,从而不能很好的消毒。

[0003] 目前最为常用的 AMF 孢子表面消毒方法有:“Kitasato beaker”法和“Eppendorf surface sterilized”法。“Kitasato beaker”法由英国科学家 Mosse 在《Transactions of the British Mycological Society》1959 年 42:273-286 “The regular germination of resting spores and some observations on the growth requirements of an *Endogone* sp. causing vesicular-arbuscular mycorrhiza”中提出,是一种基于抽滤系统进行消毒的方法,通过不断添加消毒液使孢子始终浸在消毒液中来达到孢子表面消毒的目的,该方法虽具有较好的消毒效果,但其操作复杂且需要专门仪器的辅助,如真空泵和专门的无菌罩,另外该方法操作区域较大会损失大量孢子;“Eppendorf surface sterilized”法由西班牙科学家 Cano 等在《Mycorrhiza》2008 年 V:627-654 “In vitro cultures open new prospects for basic research in arbuscular mycorrhizas”中提出,是一种通过离心来实现孢子表面消毒的方法,该方法是将孢子转移到装有消毒液的 Eppendorf 管中,通过离心在离心力的作用下使孢子浸没在消毒液中实现表面消毒的,这种消毒方法需要离心机的辅助,虽然在一定程度上能实现 AMF 孢子的表面消毒,但由于操作比较剧烈,表面消毒后孢子的活力会降低。

### 发明内容

[0004] 本发明为实现 AMF 孢子的表面消毒,使消毒过程不致造成孢子的损失同时又不影响孢子的活力,公开了一种 AMF 孢子的表面消毒方法。

[0005] 本发明是通过以下技术方法实现的:

[0006] a. 取两张滤纸将其边缘上折后铺入其中一个培养皿内,裁剪一些吸水纸放入其它几个培养皿内,另留二个空培养皿不放滤纸与吸水纸,将培养皿包严,备用蒸馏水,对培养皿和蒸馏水进行高压蒸汽灭菌;

[0007] b. 配制含有氯胺 T、氯霉素、硫酸庆大霉素、硫酸链霉素和吐温-20 共 5 种试剂的孢子表面消毒液,将消毒液通过微孔滤膜过滤除菌;

[0008] c. 打开装有双层滤纸的培养皿,将载有 AMF 孢子的滤纸片放入培养皿内的双层滤纸中间,用胶头滴管吸取消毒液滴加在上层滤纸上,使整个双层滤纸浸透并在上层可见消毒液,将培养皿封盖;

[0009] d. 消毒过程中如需更换消毒液,可通过转移双层滤纸至装有吸水纸的培养皿内吸取消毒液,再转至另一套空培养皿中重新添加消毒液;

[0010] e. 在消毒完成后,将双层滤纸转移到装有吸水纸的培养皿中,用吸水纸吸取双层滤纸所吸附的消毒液;

[0011] f. 转移双层滤纸至装有吸水纸的另一培养皿中,用胶头滴管在上层滤纸中添加无菌水,利用吸水纸吸取水分,重复操作 3-5 次;

[0012] g. 取出上层滤纸并倒置放入另一培养皿中,解剖镜下分别检查并转移上层滤纸、下层滤纸和滤纸片上的 AMF 孢子,AMF 孢子的表面消毒完成。

[0013] 本发明通过双层滤纸和培养皿的组合实现了对 AMF 孢子的表面消毒。该方法操作简单温和、消毒液用量少,消毒前后不会丢失孢子,也不影响孢子的活力,同时消毒过程中也不需要其他仪器的辅助。

### 附图说明

[0014] 附图 1 是本发明 AMF 孢子表面消毒示意图。

[0015] 附图 2 是本发明表面消毒后用无菌水清洗 AMF 孢子的示意图。

[0016] 附图标记为:胶头滴管 1,消毒液 2,上层滤纸 3,孢子 4,滤纸片 5,培养皿 6,下层滤纸 7,无菌水 8,吸水纸 9。

### 具体实施方式

[0017] 以下结合附图对本发明做进一步详细描述:

[0018] a. 备用 10 套 60mm 的玻璃培养皿、直径为 75mm 的普通滤纸和吸水纸,取两张滤纸将其边缘上折后铺入培养皿底,其上折的边缘与培养皿壁留有空隙以便转移,裁剪一些吸水纸,大小刚好放入培养皿底,4 张一组放入培养皿内,共放置 7 套培养皿,另留二套空培养皿以备转移双层滤纸,将培养皿包严,备用 200ml 蒸馏水和 2 支胶头滴管,对培养皿、蒸馏水和胶头滴管在 121℃ 下高压蒸汽灭菌 20min;

[0019] b. 配制含有 50g/L 氯胺 T、50mg/L 氯霉素、100mg/L 硫酸庆大霉素、200mg/L 硫酸链霉素和 0.05% 吐温 -20 的孢子表面消毒液 20mL,将消毒液通过 0.22 μ m 孔径的微孔滤膜过滤除菌;

[0020] c. 整个孢子表面消毒过程在室温条件下,放置于超净工作台上进行,打开装有双层滤纸的培养皿,将载有孢子的滤纸片放入培养皿内的两层滤纸正中,用胶头滴管吸取消毒液从一侧开始滴加在双层滤纸的上层滤纸上,使整个双层滤纸浸透并在上层可见消毒液,封盖培养皿,消毒液滴加过程中避免产生气泡;

[0021] d. 消毒过程中如需更换消毒液,可通过转移双层滤纸至装有吸水纸的培养皿内吸走消毒液,再转至另一套空培养皿中重新添加消毒液来实现;

[0022] e. 消毒时间为 15min,消毒完成后,将双层滤纸转移到装有吸水纸的培养皿中,用吸水纸吸取滤纸吸附的消毒液;

[0023] f. 转移双层滤纸至装有吸水纸的另一培养皿中,用另一个胶头滴管在上层滤纸表面添加无菌水,利用吸水纸从下层滤纸吸收水分,重复操作 5 次;

[0024] g. 取出上层滤纸并倒置放入另一套培养皿内,解剖镜下分别检查并转移上层滤纸、下层滤纸及滤纸片上的 AMF 孢子,AMF 孢子的表面消毒完成。

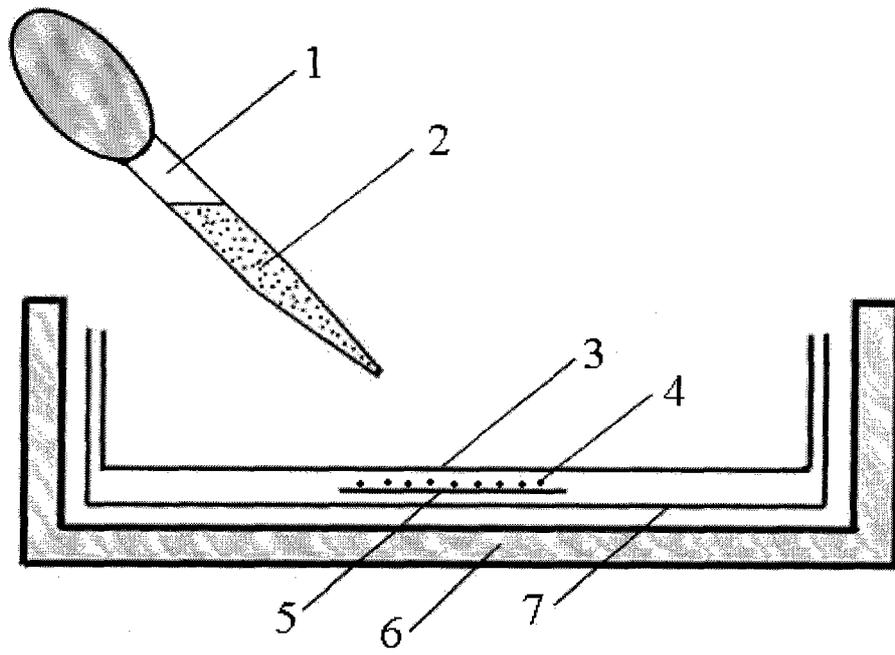


图 1

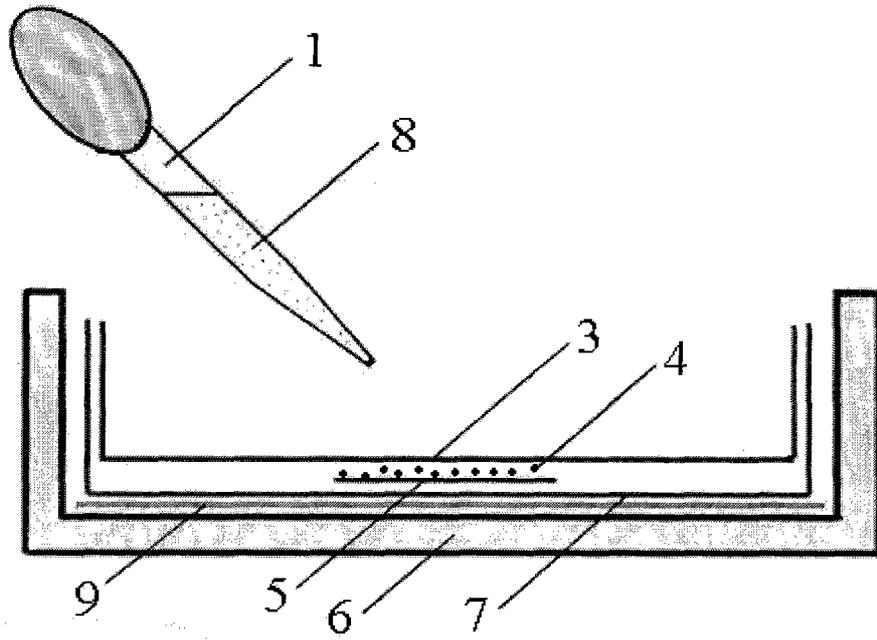


图 2