



PPM (Plant Preservative Mixture)

植物组培抗菌剂 说明书

植物组培抗菌剂 (PPM™) 是用于植物组织培养的广谱性杀菌剂。PPM™可最终解决由空气、水和内源性微生物引起的污染。

产品描述:

储存环境: 4°C 产品货号 PPM

植物组培抗菌剂 (PPM™) 是用于植物组织培养的广谱性杀菌剂。PPM™通过抑制微生物的柠檬酸循环和电子传递链中的关键酶的活性,能有效抑制植物组织培养基中的细菌、真菌和外植体自带的微生物的生长。PPM™使用剂量依赖于受污染的程度,在植物组织培养基中是一种生物抑菌剂。此外,PPM™也作为一种生物静态化合物起作用,作为一种预防措施。当用植物组织培养基稀释 PPM™作为微生物杀菌剂(比如杀细菌剂和杀真菌剂)来抑制固体或半固体植物组织培养基中的非人类健康病原体是非常有效的。PPM™对大多数的种子暴露的植物都是有效的-被子植物和裸子植物,然而我们并不推荐将其用于蕨类、苔藓类、藻类和水生植物上。为了达到抑菌效能最大化则需要优化试验体系,虽然 PPM™是一种预防和抑制培养污染物的优秀工具,但这并不能取代无菌的实验室技术和合适的空气处理系统。

物理性质

物理形式: 液体

外观: 无色到琥珀色

pH: 3.8

稳定性 : 4°C 储存

PPM™可以在灭菌前加入培养基中,也可以直接加入已灭菌的培养基中。

耐高温高压, 1.05kg/cm²(15psi), 121°C, 20min。

在含蛋白质的培养基灭菌后应该再加入 PPM™。

PPM™的最终浓度(溶解在培养基中)在室温下能稳定保存长达 1 个月。

常规用法

以下使用说明是一个常规的使用方法。最优的使用方案需要进一步优化。

PPM 快速入门	预防	消毒	农杆菌
浓度 (v/v)	0.05 – 0.2%	5.0% (见注释)	0.05%
处理时间	持续	4 – 12 h	持续
注释	a.针对植物组织类型不同,试验方案需要进一步优化。 b.用于刚分离的原声质体和愈伤组织用 0.05%。	a.将植物材料放入 3×MS* 培养基中搅拌 4-12h。 b.不要结合其他的杀菌剂一起使用。不要调节 pH 值。 c.用 PPM 处理过的组织可以直接放置 0.05%PPM 的培养基中。	可以和抗生素配合使用。
MS*这里的 MS 培养基只是泛指,根据您的具体材料可选择相应的培养基。			



PPM (Plant Preservative Mixture)

植物组培抗菌剂 说明书

产品专利信息

专利号：5,750,402-- PPM 在组织培养基中某一特定浓度下的配方以及在特定浓度下使用防止或消除微生物的污染是受到美国专利保护的，专利号为：No. 5,750,402。此项专利已经在加拿大，新西兰，澳大利亚，欧盟，以色列和其它国家发布。世界其它国家也正在申请中。

PPM 介绍

PPM™ (Plant Preservative Mixture)是一种热稳定的抑菌剂，根据不同的使用剂量能有效地预防和减少植物组织培养中的微生物污染。在最佳的使用剂量，PPM™不会损害体外种子的萌发、愈伤组织的增殖和愈伤组织的再生。尽管采用最严格的无菌技术和无菌条件，但是植物细胞和组织培养的污染问题依然是一个持续存在问题。

PPM™抑制细菌繁殖和真菌孢子的萌发。由于其具有热稳定性，他能和培养基一起灭菌。

PPM™可以作为标准的植物组织培养基成分。PPM™比抗生素价格低并能同时抑制真菌污染。

PPM™作为一种生物抑菌剂，除了能抑制空气、水和人接触性污染外也能降低外植体的内源性污染。

作用机理

PPM™是一种广谱性抑菌剂，能杀死细菌和真菌，抑制真菌孢子萌发，且高浓度的 PPM 能抑制外植体的内源性污染。

研究表明，PPM™的活性成分能渗透到真菌和细菌的细胞壁中通过抑制代谢中心如柠檬酸循环和电子传递链中关键酶的活性来杀死微生物。我们的研究数据显示 PPM™也能抑制培养基中的单糖和氨基酸向细菌和真菌的细胞中运输。

无论何种杀菌剂，为了杀死细菌和真菌对应的杀死每个微生物所需要的 PPM™分子的临界值是需要知道的。

与抗生素相比的优点：

PPM™是广谱、高效抗细菌/真菌剂。

PPM™的性价比更高，可以作为植物组织培养中的标准成分，广泛地用于常规试验。

PPM™的作用原理是抑制多种酶活性，因此 PPM 引起外植体突变的机率很小。

PPM™具有热稳定性，可以和培养基一起灭菌。

PPM™使用技术指南

以下描述的使用方法是通用的，对于具体的植物材料可能需要稍加改动。

PPM™极其简化地组织培养的工作流程如下：

1. 含 PPM 的培养基可以在超净工作台外分装，等琼脂凝固后要尽快盖上盖子。如果培养基是采用分装器分装的，我们建议在分装前后先将热压处理过的热水处理分装管。
2. 含有 PPM 的热敏感或热稳定的培养基不需要过滤灭菌或高压灭菌，前提是储存在无菌的容器中，这样培养基也不会被污染。如果培养基中含有大于等于 200mg/L 的氨基酸或蛋白质，我们建议在加入 PPM 后培养基需要过滤灭菌。
3. 在超净工作台上里的器具（钳子或解剖刀）不需要用火灼烧，但在使用前需要定期地在 70%酒精里蘸一下。超净工作台无需验证，可以在超净工作台外环境较干净的台面工作，但不要超过 1 小时。
4. 不建议 PPM 直接用于种皮暴露在高密度细菌和真菌孢子环境下的种子。为了体外种子萌发，种子需要先经过传统漂白剂进行表面消毒。因此，在含有 PPM 的萌发培养基里，种子可以先用自来水冲

本产品仅作科研用途！

See more at www.maokangbio.com



PPM (Plant Preservative Mixture)

植物组培抗菌剂 说明书

洗，在超净工作台内晾干，如果器皿两端接触了细菌和真菌或疑似污染物，则这些器具应该通过高压蒸汽或电热设备进行灭菌。

5. **一般的剂量水平：**除了内源性污染，推荐使用的剂量为 0.05%-0.2%（一般用于愈伤组织的增殖，器官形成和胚胎形成所推荐的剂量为 0.05-0.075%）。为抑制较高密度的内源性污染，则需要较高剂量的 PPM（请参看以下第 6 条）

6. **内源性污染：**

- a) **种子：**不建议 PPM 直接用于种皮暴露在高密度细菌和真菌孢子环境下的种子。为了体外种子萌发，种子需要先用传统方法用漂白剂进行表面消毒。然后置于含有 2~3% (v/v) PPM 的培养基里，但千万不要添加 Tween 20 和 pH 调整剂，轻轻地搅拌 8~12 小时，之后直接拿出放入含有 PPM 的培养基里，若是草本植物换至 0.05~0.1% PPM 的萌发培养基即可；而木本植物则换至 0.2% PPM 的萌发培养基。对于种皮较硬的种子（比如芦笋、羽扇豆属植物、观赏棕榈、玫瑰等）应该在用 PPM 灭菌前先在水中浸泡 2-4 个小时。
- b) **外植体：**以 1cm 长的外植体（或者更短）为例，添加 4~5% (v/v) PPM 到全 MS 基盐中，但不要添加 Tween 20 和 pH 调整剂，搅拌 4~12 h 之后无需冲洗直接插入含有 PPM 的培养基里，若是草本植物换至含 0.05~0.1% PPM 的培养基即可；而木本植物则换至含 0.2% PPM 的培养基。
- c) **观赏植物的块茎、鳞茎和鳞状物：**把整个块茎/球茎/鳞状物在漂白剂里揉或搅拌。然后用水冲洗（可以在非无菌条件下操作）。把块茎/球茎/鳞状物切成薄片，在含有 4-5% (v/v) PPM 的全基盐中揉或搅拌 12-24 h，不要加 pH 调整剂和 Tween 20。无需冲洗直接插入到含有 0.1-0.2% PPM 的培养基中。

7. 如果按照以上操作流程没有得到满意的试验结果（尤其是特别厚的，污染较严重的外植体，种子），我们建议采用以下方法：

- a) 将外植体于水中搅拌浸泡（柔软的组织 1 小时，较硬的组织 2 小时）
- b) 把外植体放置于含有 50% PPM™ 的 MS 基盐中浸泡 5-10 min（无需加 pH 调整剂和 Tween 20）。
- c) 无需冲洗直接将外植体放于培养基中。如果有真菌污染，可以选择额外再加入 PPM 到培养基中。然而，如果有细菌或混合污染，外植体培养的第一个月在培养基里加入 0.05 - 0.2% PPM™ 是必要的。不要丢掉高度氧化的外植体，因为约 4-6 周后 50% 的外植体都会得到恢复。

注意：请参考第 9 段下面的注意事项 2 和 3

8. 拯救在培养中严重污染的植物材料（注：明显严重污染不超过 1 周的组织）

- a) 用软的毛刷在自来水的冲洗下冲洗材料，把材料放置于含有 50% PPM™ 的溶液（用无菌水配置）中搅拌 5-15 min。对于细菌性或混合性污染，我们建议用低 pH 值 2.8-3.2 的溶液处理，即 100% PPM™ 和 0.6 gr/l 的柠檬酸溶液（用灭菌水配置）以 1:1 的比例混合。
- b) 将处理好的材料直接取出，无需冲洗直接插入含 0.05 - 0.2% PPM™ 的培养基中培养至少 1 个月，在前 10 天需弱光培养，和前面描述的相同，不要丢掉高度氧化的外植体，因为约 4-6 周后 50% 的外植体都会得到恢复。

有时真菌或细菌孢子在外植体的内部是 PPM 无法接触到的，在这种情况下，需要先用水对材料浸泡一段时间，然后将外植体切成小块并放于 50% PPM 中搅拌 5-15 min。通过以上所有的消毒过程，确保 PPM 能接触到外植体的整个表面。

9. 消除农杆菌

共培养之后，先用水将外植体冲洗干净，然后将转染的外植体放于含 100% PPM 的全基盐中约 2min。取出之后用无菌纸将外植体上的 PPM 吸干，将其放于含抗生素的培养基中继续培养。三周后将外植体转入只含 0.05- 0.075% PPM 的培养基中培养。

本产品仅作科研用途！

See more at www.maokangbio.com



PPM (Plant Preservative Mixture)

植物组培抗菌剂 说明书

一般的注意事项:

- 1、 对于首次对外植体用 PPM 消毒后，我们建议将外植体完整地插入半固体培养基中。
- 2、 虽然 50%的 PPM 可以重复利用但是我们不建议。使用次数和效果依赖于处理外植体的体积和接种的密度。将 PPM 保存在 4°C可以延长其活性。如果有必要，准备好两份 PPM 溶液，第一种用于灭菌内源性污染，第二种用于处理“组织培养过程中”的污染，第二种 PPM 溶液每次使用后，需用 0.2 um 的滤膜滤灭。过滤时可在非灭菌条件下进行，同一个滤器能用于滤灭的整个过程。
- 3、 如果用 50% PPM 处理植物的效果不理想，你可以用 100% PPM 消毒。处理方法跟 50% PPM 相似，然而，用 100% PPM 处理的时间不要超过 10 min。

总结

PPM™ 能够为任何一个植物组织培养实验室带来便利，并极大地提高技术人员和实验室的工作效率。然而，每个实验室的条件有所不同，可能影响到 PPM™的使用效果，我们建议实验人员最好能遵循上述指导方针，并相应地调整参数。

推荐使用:

- PPM™能够有效地抑制空气、水和人类接触带来的微生物污染。
- 如果使用得当，PPM™能有效地消除外植体的内源性污染。
- 按照推荐剂量（0.5-2 ml/L），PPM™不会影响体外种子萌发、愈伤组织的增殖、愈伤组织的再生和不定芽的诱导。

安全说明

安全问题: PPM™是无毒的，然而，避免吸入，皮肤和眼睛接触，因为 PPM 是酸性的。PPM™对皮肤，眼睛，鼻子和喉咙有刺激。

预防措施: 我们推荐使用者配戴手套和防护镜，避免皮肤和眼睛接触，避免吸入。使用适当的/足够的通风设备。不应喷洒使用除非有直接流通，正压通风和防护设备。

急救措施: 如果吞咽摄入，给予两杯水喝下，立即看医生。眼睛和皮肤接触立即用大量的水冲洗至少 15 min。用肥皂水彻底冲洗受影响的皮肤，脱去并彻底清洗污染的衣物。如果吸入立即转移到新鲜空气的地方。

参考文献

1. Miyazaki J, Tan BH, Errington SG. Eradication of endophytic bacteria via treatment for axillary buds of *Petunia hybrida* using Plant Preservative Mixture (PPM™). PCTOC. 2010;102(3):365-372.
2. Miyazaki J, Tan BH, Errington SG, Kuo JS. Bacterial endophyte in *Macropidia fuliginosa*: its localisation and eradication from in vitro cultured basal-stem callus. Aust J Bot. 2011;59(4):363-368.
3. Lata H, Chandra S, Khan IA, ElSohly MA. Propagation through alginate encapsulation of axillary buds of *Cannabis sativa* L. — an important medicinal plant. Phys and Mol Biol of Plants. 2009;15(1):79-86.



PPM (Plant Preservative Mixture)

植物组培抗菌剂 说明书

4. Greer SP, Rinehart TA. Dormancy and Germination In Vitro Response of *Hydrangea macrophylla* and *Hydrangea paniculata* Seed to Light, Cold-Treatment and Gibberellic Acid. *J. Environ. Hort.* 2010;28(1):41–47.
5. Moghaddam S, et al. Optimization of an Efficient Semi-Solid Culture Protocol for Sterilization and Plant Regeneration of *Centella asiatica* (L.) as a Medicinal Herb. *Molecules.* 2011;16(11): 8981-8991.
6. Çolgecen H, Koca U, Toker G. Influence of different sterilization methods on callus initiation and production of pigmented callus in *Arnebia densiflora* Ledeb. *Turk J Biol.* 2011; 35:513-520.
7. Pouvreau J, et al. A high-throughput seed germination assay for root parasitic plants. *Plant Methods* 2013;9:32.
8. Marecik R, Bialas W, Cyplik P, Lawniczak L, Chrzanowski L. Phytoremediation Potential of Three Wetland Plant Species Toward Atrazine in Environmentally Relevant Concentrations. *Pol. J. Environ. Stud.* 2012;21(3):697-702.
9. Pérez Flores J, Aguilar Vega ME, Roca Tripepi R. Assays for the in vitro establishment of *Swietenia macrophylla* and *Cedrela odorata*. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 2012;14(1).
10. Nesterenko-Malkovskaya A, Kirzhner F, Zimmels Y, Armon R. *Eichhornia crassipes* capability to remove naphthalene from wastewater in the absence of bacteria. *Chemosphere.* 2012;87(10):1186-1191.
11. Kieffer M, Fuller MP. In Vitro Propagation of Cauliflower Using Curd Microexplants. *Meth Mol Biol.* 2013;994:329-339.
12. Kodym A, Temsch E, Bunn E, Delpratt J. Ploidy stability of somatic embryo-derived plants in two ecological keystone sedge species (*Lepidosperma laterale* and *L. concavum*, Cyperaceae). *Aust J Bot.* 2012;60(5):396-404.
13. Peña-Ramírez YJ, et al. Induction of somatic embryogenesis and plant regeneration in the tropical timber tree Spanish red cedar [*Cedrela odorata* L. (Meliaceae)]. *PCTOC.* 2011;105(2):203-209.
14. Haddadi F, Adb Aziz M, Saleh G, Abd Rashid A, Kamaladini H. Micropropagation of Strawberry cv. Camarosa: Prolific Shoot Regeneration from In Vitro Shoot Tips Using Thidiazuron with N6-benzylamino-purine. *HortScience.* 2010;45(3):453-456.
15. Jimenez VM, Castillo J, Tavares E, Guevara E, Montiel M. In vitro propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. *PCTOC.* 2006;86:389–395.
16. Compton ME, Koch JM. Influence of Plant Preservative Mixture (PPM) on adventitious organogenesis in Melon, Petunia, and Tobacco. *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant.* 2001;37:259-261