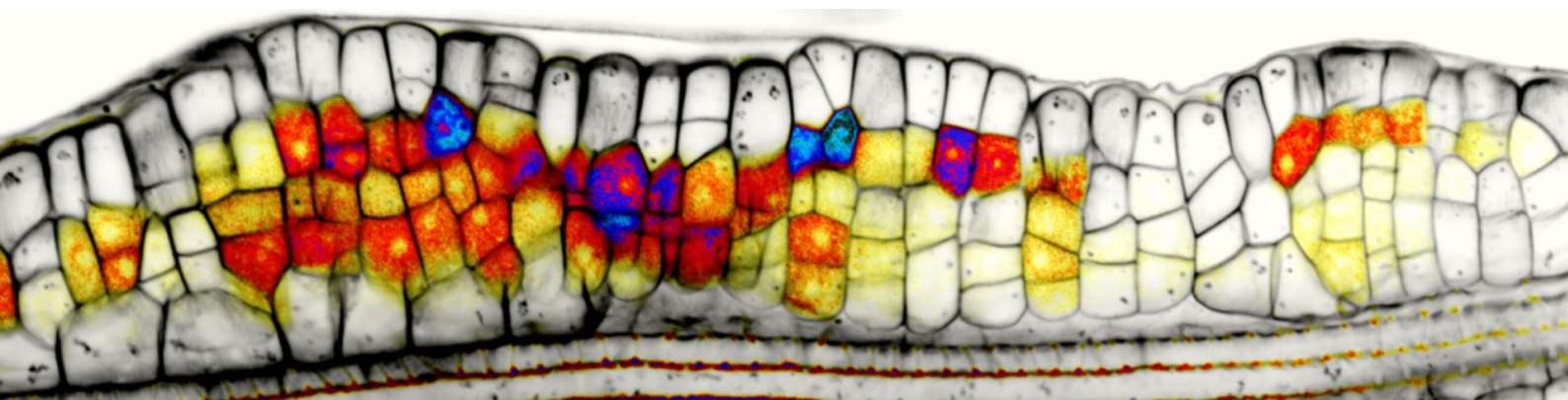




植物干细胞与再生研究组
Research group of
plant stem cells and regeneration
<http://xulinlab.cemps.ac.cn/>

植物干细胞与再生研究组 管理与实验手册 2022



中国科学院分子植物科学卓越创新中心
上海市枫林路300号

目录

第一部分，研究组管理	3
一，新生须知（曾民环）	3
二，值日生事项（曾民环）	3
三，仪器使用规则（曾民环）	3
四，显微设备管理（翟宁）	4
五，EB 胶管理规则（翟宁）	4
六，PAGE 胶管理规则（翟宁、张腾）	5
七，培养箱、摇床管理规则（刘武）	5
八，超净台管理规则（王华）	5
九，通风橱使用规则（王华）	6
十，人工气候室管理规则（王华）	6
十一，订购种子和 BAC 规则（刘武）	7
十二，普通试剂与耗材订购（曾民环，王华）	8
十三，测序、引物和 qPCR 试剂（曾民环，王华）	8
十四，实验室试剂和药品管理（王华）	10
十五，危险品试剂管理（曾民环、王华）	11
十六，研究所公用平台使用、我组平台使用（曾民环）	11
十七，生物安全规范（王华）	11
十八，内部资源及资源分享（刘武）	12
十九，考勤和学生工作（曾民环、翟宁）	12
二十，其他注意事项	12
第二部分，实验记录说明	14
一，规范的实验记录	14
二，引物记录	14
三，克隆记录	15
四，遗传实验记录	16
五，毕业时转交的记录和材料（交至刘武统一保存）	16
第三部分，实验设计和数据处理	18
一，图片处理规范	18
二，BiFC 实验规范	20
三，生理实验数据处理和统计分析	23
四，qRT-PCR 和 ChIP-qPCR 实验规范和数据处理	30
附图 1，危险品清单。	34

第一部分，研究组管理

一，新生须知（曾民环）

- 1，新同学请先认真阅读此规则再进入实验状态。高年级同学带领新生开展实验前向新生说明研究组管理规则。
- 2，实验和休息空间由曾民环统一安排。请勿随意更换抽屉，若需调整请向曾民环申请。

二，值日生事项（王华）

王华安排值日生，值日生需要完成的工作：

- 1，液氮。
- 2，卷筒纸和吸水纸。
- 3，将新采购的耗材按规定摆放。
- 4，EB 胶操作区和通风橱清理。
- 5，每月第一周，当月值日的同学清理 605 的冰箱和饮水机。
- 6，值日生每周换灭菌锅和水浴锅的水。
- 7，人工气候室的耗材：手套，垃圾袋，竹签等。

三，仪器使用规则（曾民环）

- 1，勿带手套操作任何仪器（除 EB 电泳设备）！切记！
- 2，培养箱、人工气候室、-80 度冰箱、种子柜、冰箱等仪器使用空间由刘武统一分配。
- 3，仪器由曾民环管理。若发现仪器异常必须及时告知曾民环。
- 4，初次使用时，务必在师兄师姐或各位老师指导下使用。
- 5，仪器使用完毕后，需将公用空间和仪器清理干净，使仪器恢复到使用前的状态。

6, 非本实验室人员使用各仪器之前必须联系本实验室老师（曾民环、王华、刘武），并在指导下使用，以免损伤仪器。使用完毕后请登记。任何同学不能擅自同意非本实验室人员使用仪器。

四，显微设备管理（翟宁）

- 1, Confocal 和显微设备施行预约制度（比如：ZN, 20220215, 9: 00-15: 00）。
- 2, 组外人员使用显微设备前需要和王老师报备并预约，特别是使用 CLSM 前需要和徐老师报备并在本组人员的指导下学习使用步骤。
- 2, 请勿带手套操作 Confocal 和显微镜。如使用有害试剂（如透明液），观察完后必须擦拭 Confocal 和显微镜的载物台，保持清洁。使用 confocal 后，请清洁镜头。
- 3, 显微镜的镜头切换请勿直接拨动镜头，应该转动镜头座。
- 4, 使用完毕后，请关闭电源，并盖上保护罩。

五，EB 胶管理规则（翟宁）

- 1, 使用后的胶托以及胶槽的残胶一定要及时清理。如果不及时清理胶托和胶槽间的残胶，时间久了风干后会形成带 EB 的灰尘，影响身体健康。公用平台上不存胶。
- 2, 凝胶成像系统和紫外灯使用后一定要及时关闭透射电源和紫外光源。长时间开着透射和紫外光源会缩短仪器的使用寿命。
- 3, 用过的一次性手套不要随意丢弃在电泳区桌上，请放入垃圾桶中，并顺手压一下。因为 EB 电泳区风很大的时候，手套比较轻，很容易被吹走，四处飘，这样很容易造成 EB 污染。
- 4, 跑过的、不再用的胶请及时清理，不要留在凝胶成像系统，紫外灯以及电泳区桌面上。
- 5, 使用完的胶梳，放到塑料泡沫上，请不要随意堆在桌上。
- 6, 加 EB 用的枪头请勿直接深入热胶内，以免堵塞枪头。
- 7, EB 胶及核酸电泳操作台的卫生每周由当周值日生和翟宁监督，且值日生每周必须全面清洗至少一次才能交接至下一值日生。

8, 管理员会要求严重违反上述规定的同学进行 **EB 胶台全面清理**。

六, PAGE 胶管理规则 (翟宁、张腾)

- 1, PAGE 胶**配胶操作请在自己的实验桌上进行**, 跑胶和转膜可在公共操作台进行, 并注意保持清洁。配胶过程中, 建议在玻板和海绵间放置 Parafilm 膜。
- 2, 操作过程中是否需要戴手套, 现在暂不做规定。但做完实验后, 请一定清洗干净 (如有必要请在专用塑料盆中用洗涤液清晰), 并**不带手套将设备放回原位**。
- 3, 各仪器设备请**保持整洁**, 不要随意乱放。
- 4, 如有发现污染公共操作平台的现象, 管理员会要求该同学对公共操作平台**进行全面清理**。

七, 培养箱、摇床管理规则 (刘武)

为了有效合理利用植物培养箱、37°C 培养箱、29°C 培养箱、37°C 摇床、及 29°C 摇床, 并保持卫生, 我们制定规则如下:

- 1, **请在平皿和试管上写上自己的名字, 未写名字的平板和试管一律清除**。29°C 培养箱中的平板请注明日期。
- 2, 严谨带土植物进入植物培养箱。
- 3, 实验完成的平板及被污染的平板, 请及时取出。

八, 超净台管理规则 (王华)

- 1, 超净台安排: 每个超净台上贴有适用实验要求, 请严格遵守。

带有抗性的大肠杆菌的实验, 仍旧希望能在各个同学的实验台上操作。其余微生物实验, 可在指定超净台上操作。

- 2, 为了保持超净台整洁, 请每位同学在实验时自带篮框, 实验结束后, **超净台内、外不能留**

有任何物品（除了酒精灯和酒精棉）。

3，灭菌步骤：

（1）紫外灭菌 20 分钟（风机关闭）。（2）关闭紫外，打开风机 10 分钟，排除臭氧。

九，通风橱使用规则（王华）

1，“抽气”和“阀门”开关始终保持开启。使用后将“电灯”开关关闭。

2，废液、废枪头及离心管等回收指定桶内。

3，通风橱使用完毕须拉下玻璃门，并随身带走所有实验用品，原则上通风橱只允许保留废固液桶，使用到的有机试剂必须物归原处。

4，通风橱卫生每周由当周值日生和王华监督，且值日生每周必须全面清洗至少一次才能交接至下一值日生。

5，带有挥发性和有毒试剂实验，请在通风橱中操作，以免引起环境污染。

十，人工气候室管理规则（王华）

1，种植。

（1）用土：进口黑土，每次装盒量为 2/3 体积，土质松软。

（2）第一次浇水：浇水时从上往下，只需自来水（无需营养液和农药），盘内不允许有积水。

（3）播种：每一盒内尽量控制在 5 棵植物以下。

（4）标记：每个盒子必须写上姓名，没有标记的植物会被统一处理。

2，维护。

（1）除发芽和移苗外，请不要用保鲜膜包裹植物。

（2）已成熟的绿色植物请移至第四层；黄色成熟植物请移至外间准备室，并及时收种。

(3) 竹签、标签纸、垃圾桶、小金条等使用完毕后及时清理，置于外间准备室。气候室内保持整洁。

(4) 准备间物品使用完成后请放回原处，垃圾和垃圾桶请及时清理，保持环境整洁。

3, 统一管理。

(1) 平时浇水由王华统一负责，各位同学请不要自行浇水（包括植物转化）。土壤应维持表面干燥，内部湿润。盘内不能有积水。遇到浇水问题请联系王华。第四层植物停止浇水。

(2) 平时控制病虫害由王华统一负责，各位同学请不要自行打药。

(3) 植物成熟后请及时收种，废弃植物请及时清理。

(4) 房间每 2 个月清理一次。王华统一负责时间安排。

(5) 准备间架子仅用于临时存放待收种植物，架子每月清理一次，由王华负责并通知清理时间。

十一，订购种子和 BAC 规则（刘武）

1, 订购种子由刘武管理：

(1) 种子只能订购“CS, N, SALK_”开头的种子。

(2) 种子和 BAC 订购前，需要和徐麟讨论是否有必要订购。

(3) 每月 15 日订购一次，请同学们提前将需要订购的信息发送给刘武（liuwu@cemps.ac.cn）。

(4) 登记时写明以下信息：

时间	姓名	种子/BAC 号码	种子/质粒来源信息（种子中心，其他实验室，文献）	基因名称
2014-4-15	葛亚超	CS3077	axr2-1 突变体，点突变	AT3G23050 (IAA7)
2014-11-15	陈吕琴	CS301787	GK-053G03.01(CS301787,CS301788,CS301789,CS301790,CS301791,CS301792,CS301793,CS301794,CS301795,CS301796) 注	AT1G04180 (YUC9)
2013-5-15	徐英强	SALK_016088C	SALK	AT2G45420

				(LBD18)
2013-5-15	徐英强	MHK10	LBD16 的 BAC	AT2G42430 (LBD16)

注：**GABI (GK)** 的种子要注明杂合子库信息，否则无法派分。

2，种子到达后，由刘武派发。请同学们取出一半种子自行使用；另一半原始种子和带有标签的原始离心管交还给刘武入库。

3，订购的 BAC 请保存在自己的质粒库中，有实验记录。

十二，普通试剂与耗材订购（曾民环，王华）

1，订购常规试剂请找王华，订购常规耗材请找曾民环。

2，购买进口试剂、抗体、试剂盒等，请先与徐麟讨论，同学不能擅自订购。请以以下格式发送到徐麟的邮箱：

试剂名称：Kyn

用途：生长素内源合成抑制剂

公司：Sigma

产品编号：K8625-100MG

产品名称：L-Kynurenine

包装：100 mg

查询价格：500 元

十三，测序、引物和 qPCR 试剂（曾民环，王华）

1，每位同学每月测序加引物费用控制在 500 元。由曾民环管理。

2，SYBGreen 每位同学每月 1 包、qPCR 板子 2 个月 1 包。王华统一发放。

3，全基因合成或其他特殊项目请找徐麟讨论。

4，公用引物由王华统一保管，需要使用时由王华发放。请勿自己订购。

5，公用引物列表：

鉴定引物		
鉴定 SK 种子	pSKTAIL-L2	TGGACGTGAATGTAGACACGTCG

鉴定 Wis 种子	p745	AACGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC
鉴定 SALK 种子	LBA1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG
鉴定 SAIL 种子	Lb3	TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCTCGATACAC
鉴定 GABI 种子	o8409	ATATTGACCATCATACTCATTGC
鉴定 Ds 转座子	Ds3-1	ACCCGACCGGATCGTATCGGT
T7 启动子鉴定引物	T7	ATACGACTCACTATAGGG
T3 启动子鉴定引物	T3	ATTAACCCTCACTAAAGG
Sp6 启动子鉴定引物	SP6-F	ATTTAGGTGACACTATAGAA
35S 启动子鉴定引物	35S-promoter-F	GATGTGATATCTCCACTG
鉴定质粒 pMD19-T Simple	M13-47	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC
鉴定质粒 pER8 和 pER10	pER-F2	AATATGCTCGACTCTAGGATC
鉴定质粒 pGEX-4t-1	GST-F1	AAACGTATTGAAGCTATCCC
鉴定 3xFLAG	3*FLAG-F1	GACTACAAAGACCATGACG
鉴定 3xHA	3*HA-F1	TACCCATACGATGTTCTGAC
eYFP/eGFP 正向鉴定引物	eYFP-eGFP-F2	CAGTCCGCCCTGAGCAAAG
pBI101 反向鉴定引物	pBI101-GUS-R	GTTTTTCGCGATCCAGACTG
pBI101 正向鉴定引物	pBI101-F	GGAATTGTGAGCGGATAAC
pMAL-c4x 鉴定引物	MalE-F1	GGTCGTCAGACTGTCGATGAAGCC
鉴定质粒 p1300	1300-R	CTCTTCGCTATTACGCCAGC
RT-PCR 引物	ACTIN-F1	TGGCATCAYACTTTCTACAA
	ACTIN-R1	CCACCACTDAGCACAATGTT
	WOX5-RT-F2	GTGAAAGGTCGAAGCTTACG
	WOX5-RT-R2	GTACTGGTTATTGCCTCTAGC
	GH3.2-F	CGTATATCCAACGGCGATTG
	GH3.2-R	GTAATAACTCGTGAGAACCGG
	WOX5-F	CGGCAAGATAGAGAGCAAG
	WOX5-R	CGAAGATCTAATGGCGGTGG
	WOX11-F3	CGCAACCACCAACACTTGTGACC
	WOX11-R6	AAGACATCTGTTGCATCACC
	WOX12-F3	GGGGTTTGGAAGTTGTAGC
	WOX12-R4	CGATAGACACGAAATCAATAGAGG
	LBD16-F49	CCTGTTTATGGATGTGTCTC
	LBD16-R49	ACATAACTTACCAACTTATC
	LBD29-F51	TCATATCTTTGCTCTCCAAC
	LBD29-R51	CCCATATTCTTGATAGAACC
	PLT1-RT-F2	TCTAGTGGGAGCTACAAC
	PLT1-RT-R2	AGAACTCCTTGCCTCACC
	PLT2-F1	GGTCAACGACAATATCGAC
	PLT2-R1	GACGACTGTAGGTAACAAG

ChIP 引物	FUS3-I-F	ACTTTTGCTACACTTGTTACCA
	FUS3-I-R	CGCAACAAGATCTAATGCCACT
	ACTIN-II-F	GGCTGAGGCTGATGATATTC
	ACTIN-II-R	CCATGATGTCTTGGCCTACC
	AS1-II-F	GAAGAAGGATGGTGAGATGG
	AS1-II-R	CTCGGACCGAACTGTCTAAC
	AG-4-F	GGCTTTGGAGCAGCAATCAC
	AG-4-R	GCAAACCATTCTACGTTTGC
	PI-II-F	CTGTCAAAGTCTCTCTTCAC
	PI-II-R	CTATCTCTTTCTCAATTTAGG

十四，实验室试剂和药品管理（王华）

- 1，实验室常规药品（各种无机盐、琼脂、培养基、琼脂糖等）放置在药品柜的固定位置，使用完毕后请及时将药品放回药品柜上对应的标签位置。
- 2，各种易燃有机试剂（乙醇、氯仿、异丙醇等）统一存放在铁皮安全柜中，每位同学实验桌上只允许有无水乙醇、95%乙醇和 75%乙醇各一瓶，请不要同时开启多瓶。
- 3，各种强腐蚀性试剂、强氧化剂（盐酸、硫酸、次氯酸钠、双氧水等）及有毒和危险品试剂将存放在专用试剂柜中，如有需要请找王华或曾民环拿取，使用完毕立即归还并登记。
- 4，实验室常用酶和进口试剂备货统一由王华管理，只允许有一份试剂放在公用冰箱或固定位置供大家使用，试剂用完后联系王华从备货中拿取，严禁私自拿取备货。
- 5，实验室激素、抗生素、GUS 等原始药品由王华统一订购保存，分管同学从王华处拿取药品配成母液放置在公用冰箱供取用。
- 6，王华指定公用试剂的配制任务。

抗生素和常用试剂：	公用体系试剂：
张腾：GUS	ChIP 体系：翟宁
万启慧：Dex, CHX	原位杂交与切片：王华
谢地香：Rif, Gen	酵母体系：刘武
吴沙沙：Cb、Spe	PAGE 胶体系：张腾
翟宁：透明液、LUC	

顾泽玮: β -estradiol、酚氯仿	
李煜: Km、Chl	
王华: Hyg 潮霉素分装、DEPC	

7, 试剂配制操作规范:

- (1) pH 计和电子天平由王华调试。如遇数据不准确, 请及时联系王华。
- (2) 配制试剂请保持操作桌面的整洁, 配制完成请做好清理工作。
- (3) 药品、试剂、称量纸等物品使用完毕请放归原处, 废纸、废液、空试剂瓶等请清理掉。
- (4) 天平、磁力搅拌器等仪器使用完毕请清理干净, 复位并关闭电源。
- (5) pH 计使用时请用烧杯接盛冲洗液, 使用完毕后请及时将电极放入保存液中并关闭电源。

十五, 危险品试剂管理 (曾民环、王华)

请在曾民环的陪同下领取和订购危险品试剂。由曾民环和王华双人双锁保管。使用时请联系曾民环和王华开锁拿去, 不得私自拿取, 并在王华处详细登记使用记录。使用完毕请将剩余试剂放回相应试剂柜, 不得放在个人实验台上。危险品清单以研究所制定清单为准 (附图 1)。

十六, 研究所公用平台使用 (曾民环)

使用公用平台前请先与徐麟讨论, 并请至曾民环处登记后才能预约。

十七, 生物安全规范 (王华)

- 1, 有机试剂和有毒试剂废液请及时倒入 618 通风厨的废液桶内, 严禁随意放置和随意丢弃。
- 2, 各种菌液请每位同学先加入 84 灭活后再丢弃。尤其是农杆菌废弃前请加入 84 消毒液。
- 3, 用过的一次性培养皿请先将培养基清除干净后再丢入黄色垃圾桶中, 严禁将培养皿作为生活垃圾处理。禁止随意丢弃。
- 4, 不需要的种子和含成熟种子的植物、转基因水稻等可能污染环境的植物, 请用报纸包裹好

后放置到专用丢弃箱（标记有“生物安全”），将由王华统一进行灭活。

十八，内部资源及资源分享（刘武）

- 1，从其他研究组索要材料（种子、质粒、抗体等），请先与徐麟讨论。请勿擅自索要材料。所有材料请在刘武处登记。
- 2，其他研究组问我们索要种子、质粒等材料，请先与徐麟讨论。请勿擅自给予材料。所有材料请在刘武处登记。
- 3，实验室资源（种子、质粒、菌种等）由刘武管理，需要时请刘武拿取。同学不能私下拿取实验室资源。

十九，考勤和学生工作（曾民环、翟宁）

- 1，根据国科大和研究所规定，研究组成员在工作日请每日登录考勤，由曾民环检查出席情况。
- 2，请假请至少提前一天与徐麟和曾民环邮件或微信联系并获得批准。
- 4，心理健康建设：如自身或身边同学遇到行为问题、饮食作息紊乱、情绪问题、发生重大生活事件、言行异常等情况，请及时与曾民环联系。曾民环填写研究生问卷。
- 5，实验记录每月第一天交至曾民环和翟宁处检查。

二十，其他注意事项

- 1，请保持实验室卫生，耗材和试剂请按照规定摆放。请不要将带土植物放入 616 房间。
- 2，请注意休息室个人卫生，这很重要！请保持桌面干净整洁，个人物品不要堆放在桌子以外的其他空地方，保持由值日生负责检查监督。
- 3，空调外机周围请勿堆放杂物，以免堵塞下水口。
- 4，每天最后一位离开实验室的同学请关掉 PCR 仪、制冰机、180 度烘箱、电脑、中央空调室

内开关及中央空调外机、关灯、锁门。

注：616 房间空调请不要关闭。

5, 实验室网站由刘武和曾民环管理。实验 Protocol、手册、高通量数据查询、实验材料等查询可在我们的网站上找到链接或下载: <https://www.medical.net/xulab/index.php>

6, 实验室安全由曾民环负责, 如遇到紧急情况, 请及时联系曾民环。

7, 灭菌锅请在王华的陪同下使用, 注意使用安全。

8, PCR 仪不要设置无限时保温 (比如低温过夜保存)。

8, 组外人员、实习生、临时人员在我组进行实验和其他工作, 请先在曾民环处登记备案, 并遵守我组管理规则。

9, 各位老师的联系方式:

徐 麟: 手机 15021199123; 座机 021-54924101; 邮箱 xulin@cemps.ac.cn

曾民环: 手机 15800502185; 座机 021-54924085; 邮箱 mhzeng@cemps.ac.cn

王 华: 手机 13917237404; 座机 021-54924085; 邮箱 wanghua@cemps.ac.cn

刘 武: 手机 15821048126; 座机 021-54924085; 邮箱 liuwu@cemps.ac.cn

翟 宁: 手机 13671717945; 座机 021-54924086; 邮箱 zhaining@cemps.ac.cn

第二部分，实验记录说明

一，规范的实验记录

- 1, 实验结果无论正负，都应有条理地记录，记录尽量详尽，一律用水笔和记号笔记录，不要使用铅笔。
- 2, 建议以实验项目来整理记录，每本实验记录本可单独记录一类实验（如克隆、qRT-PCR 等）。
- 3, 实验记录本记录内容至少包括：实验日期，实验材料（如小苗生长日期，取材信息等），实验方法有无改变，实验参数有无改变（如超声条件），实验结果，实验结果分析，实验重复性比较等。
- 4, 生理实验记录详细实验流程、参数条件、出现的问题、改进的步骤等。
- 5, 分子生化实验（如 Western blot 等），请将实验结果扫描、拍照后，打印贴在记录本上。原始照片保存为电子版本。PCR 胶图打印后贴于实验记录本上。
- 6, 电子版本结果（如胶图，real-time PCR，照片等），更改文件名，要求与实验记录本上一一对应，并定期整理到相应文件夹（在文件夹中附带电子版本说明）。
- 7, 相机内照片及时拷走。实验室会半年统一清理一次。

二，引物记录

请在 Excel 文档中按以下格式记录。

引物名称	引物序列	说明
0763-XL-CHR17-R7	CGTGTGCCTCCAGATCCAAC	RT-PCR
0764-XL-CHR11-F8	GCAGAAGATTCAAGAGATGC	RT-PCR
0765-XL-17KRF1	GAAATGGGTCTGGGGAGAACGCTTCAAACC	克隆
0766-XL-17KRR1	GGTTTGAAGCGTTCTCCCCAGACCCATTTC	克隆
0767-XL-17KRR2	gtcgacTTATTTCTACGCTTTCCCGAG	Sall
0768-XL-CHR17-F8	ACATAGCAATGCAATTGCGG	gPCR

注意：

- （1）引物序列为大写正体，酶切位点为小写正体，Tag 序列为大写斜体。

(2) 引物名称必须包含编号和姓名缩写。

(3) 如有必要，请标记此引物的用途，如“用于 qRT-PCR”。

三，克隆记录

1，请在 Excel 文档中按以下格式登记克隆。

质粒和菌种编号	质粒名称			菌种名称
XL-431-1	pGADT7X-X8			TOP10
XL-432-2	pGADT7X-X7			TOP10
XL-433-2	pGEX-4T-1-3xFLAG-X8			TOP10
XL-434-1	pGEX-4T-1-3xFLAG-X7			TOP10
XL-435-2	pGEX-4T-1-3xFLAG-LHP1(without 21nt)			TOP10
XL-436-1	p1300-35S-3xFLAG-X7 (429)			GV3101
XL-437-1	pGEM-T-easy-HAM1			TOP10

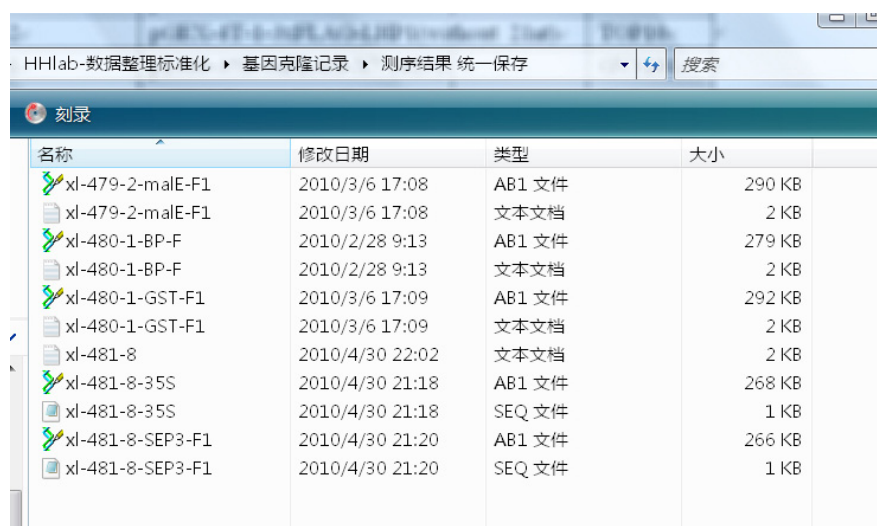
2，基因克隆实验记录：

(1) 实验设计。请详细记录每个基因的详细信息，包括序列、突变体信息、引物设计、克隆设计等。克隆结束后请打印并统一保存。

(2) 克隆过程。请将克隆过程记录在实验记录本上，PCR、酶切等鉴定结果请打印出来贴在记录本上。

(3) 质粒和菌种的保存。请统一编号，如 xl-481-8。编号中要写入自己的名字缩写。质粒和菌种编号统一。

(4) 测序结果。测序结果请按照 Excel 表格中质粒、菌种的编号重新命名。文件名中同时加入测序引物名称。例如：xl-481-8-SEP3-F1。其中 xl-481-8 为质粒、菌种名称；SEP3-F1 是测序引物。



名称	修改日期	类型	大小
xl-479-2-malE-F1	2010/3/6 17:08	AB1 文件	290 KB
xl-479-2-malE-F1	2010/3/6 17:08	文本文档	2 KB
xl-480-1-BP-F	2010/2/28 9:13	AB1 文件	279 KB
xl-480-1-BP-F	2010/2/28 9:13	文本文档	2 KB
xl-480-1-GST-F1	2010/3/6 17:09	AB1 文件	292 KB
xl-480-1-GST-F1	2010/3/6 17:09	文本文档	2 KB
xl-481-8	2010/4/30 22:02	文本文档	2 KB
xl-481-8-35S	2010/4/30 21:18	AB1 文件	268 KB
xl-481-8-35S	2010/4/30 21:18	SEQ 文件	1 KB
xl-481-8-SEP3-F1	2010/4/30 21:20	AB1 文件	266 KB
xl-481-8-SEP3-F1	2010/4/30 21:20	SEQ 文件	1 KB

四，遗传实验记录

1，突变体记录要按照传代记录。

(1) 比如 lph1-6 line2-3-8, 说明突变体 allele 是 lhp1-6, 第一次鉴定到 Line2, 后代为 Line2-3, 再传一代为 line2-3-8。

(2) 突变体的记录和遗传记录本上要一一对应。

(3) 突变体的 PCR 鉴定结果要打印后贴于实验记录本上。

2，转基因植物记录。比如 35S:SEP3 转基因植物 T2 代 line4。转化质粒为 LG-002。

3，植物遗传中的表型观察，生理统计，Marker line 观察等记录，请详细记载。

4，需要最终保留的种子要有编号。

五，毕业时转交的记录和材料（交至刘武统一保存）

1，实验记录本，克隆记录整理。

2，实验记录电子版。

(1) 请按照实验记录本上的记载，归纳整理文件夹。

(2) 每个单独的文件，请重新命名，并能通过实验记录本上找到该文件。

(3) 电子版请刻录到 DVD。

3, 菌种 (−80 度)。

请按照序号保存。管盖上记录编号, 与 Excel 文档保持一致, 管壁上记录其他信息。

4, 质粒 (−20 度)。

(1) 质粒必须用碱法提取, 不能加入 RNase。

(2) 质粒按照序号保存, 与 Excel 文档保持一致。管盖上记录编号, 管壁上记录其他信息。

(3) 每一个克隆必须要带有一份 PDF 版本克隆图记录, 详细记录克隆过程和信息, PDF 的编号与克隆记录编号一致。

5, 种子。

(1) 凡是发表的种子必须有高质量和数量的库存。

(2) 保存的种子必须有实验记录, 并以 Excel 文档记录如下。

工作簿1 - Microsoft Excel 非商业用途						
开始 插入 页面布局 公式 数据 审阅 视图						
	B	C	D	E	F	G
种子编号	种子名称	来源	背景	文献	鉴定	说明
x1-seed-001	<i>emf2-11</i>	GK-685A01	Col-0	PLoS Genet. 8(8): e1002911 实验室自己构建	突变体PCR鉴定引物: (1) 基因组鉴定 (约1.1 kb): F: ctggtataactgtccattgc R: CATTGTCTCAGTCTTGAGGG (2) T插入鉴定 (约500 bp): R: CATTGTCTCAGTCTTGAGGG o8409: ATATTGACCATCATACTCATTGC	此突变体无 Km, Hyg抗性
x1-seed-002	<i>clt-50</i>	J. Goodrich	Ws	Development. 131:5263	点突变	
x1-seed-003	35S:3xFLAG-X7	质粒XL-436-1	Col-0	未发表, 实验室自己构建	转基因	Hyg抗性

6, 在正式答辩前完成交接。

第三部分，实验设计和数据处理

（感谢刘杰和陈吕琴的整理工作）

一，图片处理规范

1，根据 Development 杂志 General guidelines for preparing figures:

（1） Do not add to, alter, enhance, obscure, move or remove a specific feature of an image – the focus should be on the data rather than its presentation (e.g. do not ‘clean up’ backgrounds or remove/obscure imperfections and non-specific bands).

不得添加、修改、增强、掩盖、移动或移除图片中的某个细节，要专注于数据本身而不是数据的呈现效果（比如不能“清理”背景或者移除、掩盖图片中的瑕疵或非特异条带）

（2） Adjustments should be applied to the whole image so no specific feature of the original data, including background, is obscured, eliminated or misrepresented as a consequence. Alterations such as non-linear adjustments must be disclosed in the appropriate figure legends and in the Materials and Methods section.

对图片仅能做整体上的调整，以确保原始数据的特定细节（包括背景）不被掩盖、消除或误读。非线性化调整等处理必须在相应的图注及材料与方法部分做出声明。

（3） The splicing of multiple images to suggest they represent a single micrograph or gel is not allowed.

不得将多幅图片的拼接结果作为单幅显微图像或凝胶图像来展示。

（4） Any grouping or consolidation of data (e.g. removal of lanes from gels and blots or cropping of images) must be made apparent (i.e. with dividing lines or white spaces) and should be explicitly indicated in the figure legends.

任何对数据的成组或合并处理（例如从凝胶或杂交图像中移动泳道或者截取图片）必须呈现明显的痕迹（比如使用分割线或留白），并在图注中明确指出。

（5） On all images of gels and blots, at least several band widths should be retained above and below cropped bands.

在所有凝胶或杂交图像中，所截取条带的上部和下部均至少保留几条条带宽度的空间。

(6) A positive and a negative control and a set of molecular weight markers must be indicated on all images of gels and blots

在所有凝胶或杂交图像中，必须标注正对照、负对照和一套分子量标记。

(7) High-contrast gels and blots are unacceptable (i.e. no white backgrounds) – grey backgrounds are expected.

高对比度的凝胶或杂交图像是不被允许的，图片背景应当是灰色而不是纯白的。

(8) The same data in whole or part should not be presented in multiple figures (e.g. loading controls; different exposures of the same gel), unless explicitly stated and justified.

除明确表述并获准外，同一数据的整体或部分均不可在多幅图中呈现（如上样量对照及同一凝胶图像的不同曝光处理）。

(9) Previously published data in whole or in part (e.g. loading controls) should not be presented.

已发表数据的整体或部分（如上样量对照）均不可再次使用。

(10) All figures containing micrographs must contain a scale bar.

所有包含显微图像的图片都必须标注比例尺。

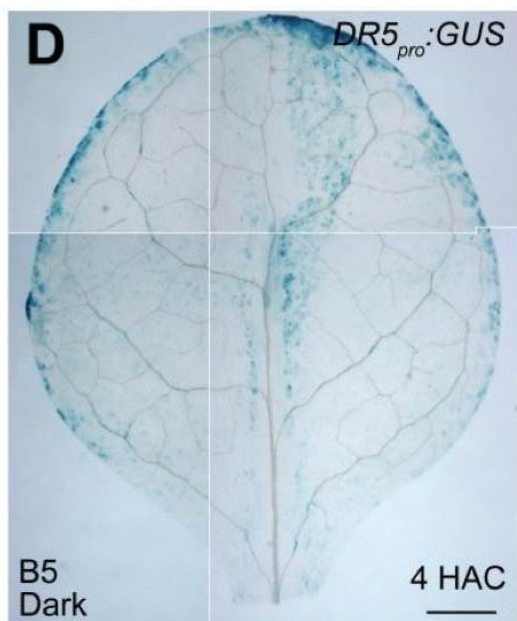
2，图片拍摄时请尽量调整到合适的亮度和对比度，可以多种亮度/对比度拍摄多张照片。显微图片不同放大倍数拍摄完整。每张图片必须要带有标尺。

3，图片拼接。

实验中不可避免要将多张图拼接在一起组成完整的一张图。Development 杂志也给出了拼图的严格规定，参见 General guidelines for preparing figures (3) (4)。具体操作如下：

(1) 拍摄高分辨率的部分组成图。

(2) 利用 Photoshop 手动拼接，一定要带有标尺。拼接处必须留有明显痕迹，如下图所示。



二、烟草 Co-IP 和 BiFC 实验规范

BiFC 实验规范

注意：一般来说，需要至少两种基本独立的方法的证据来得出关于蛋白质-蛋白质相互作用的确切结论

参考文献：： Lighting the Way to Protein-Protein Interactions:

Recommendations on Best Practices for Bimolecular Fluorescence Complementation Analyses. Plant Cell, 2016, 28:1002-1008

实验要求：

BiFC 是基于荧光互补(FC)，通过将荧光蛋白的 N 端和 C 端片段共表达后重组成为具有生物活性的荧光蛋白(FP)。为此，一个 FP 被分离成非荧光的 N 端和 C 端片段，这些片段与两个感兴趣的蛋白质（即一对可能相互作用的蛋白质）进行融合。活细胞中融合蛋白相互作用后，N 端和 C 端 FP 片段接近，导致功能荧光团重组发光。因此，BiFC 分析不仅可以检测蛋白质-蛋白质之间的相互作用，而且还可以提供关于所观察到的蛋白复合物的亚细胞定位的信息。需要记

住的是，荧光团重组的要求是两个感兴趣的蛋白质的空间接近性，而不一定是它们之间的直接相互作用。例如，如果这两个感兴趣的蛋白质是蛋白质复合物的一部分，但不直接相互作用，荧光互补可以发生，仅仅因为两个 FP 片段彼此足够接近。

(1) 注意添加感兴趣的蛋白基因与 FP 基因之间的连接序列（长度不同，但通常至少有 5 个氨基酸长），这可能对为融合蛋白提供足够的结构灵活性，以促进感兴趣的蛋白之间发生相互作用后的 FP 片段的重组很重要。

(2) BiFC 的一个特征是 FP 重组的不可逆性。这一特征在很大程度上阻止了使用基于 bifc 的技术来分析蛋白质复合物形成的动态过程或蛋白质-蛋白质动态相互作用过程。但是另一方面，形成的蛋白质复合物的稳定性有助于可视化，即使是弱的或短暂的相互作用（例如，蛋白质激酶与底物的相互作用），可以用 BIFC 方法进行检测。

(3) 目前的 BiFC 系统的主要局限性：这很可能是来自 FP 重组的不可逆性质，由于荧光团的非特异性自组装的倾向，导致假阳性荧光信号。当给定细胞定位的两个 eYFP 片段(或其他 FP 片段)的浓度超过一定的阈值时，在待检测的蛋白质之间没有相互作用的情况下，功能 FC 可以自发发生。

(4) 严格的对照（如下图所示）更为必要，因为绝大多数 BiFC 检测涉及候选蛋白会发生短暂过表达。结合 FP 重组的不可逆性，FP 融合的过表达可以导致蛋白质之间短暂的人为的相互作用，但有可能这些蛋白质通常在生理浓度下不会相互作用。同样需要注意的是，虽然蛋白质-蛋白质相互作用存在特异性的进化压力，但只有给定的蛋白质在同一亚细胞室或者在同一细胞类型、发育阶段和/或环境条件下表达，才会选择非特异性相互作用。这些都是需要验证的重要方面。

(5) 在选择蛋白质融合的方向时(即 FP 片段融合到目标蛋白的 N 端或 C 端；图 1O 和 1P)，还必须确定蛋白质定位的靶向信号不被阻断(例如，核定位或内质网和导入质体或线粒体的 N 端转运肽)。

(6) 注意 western 或其他方法检测负对照的两个蛋白是否正常表达

对照设计：

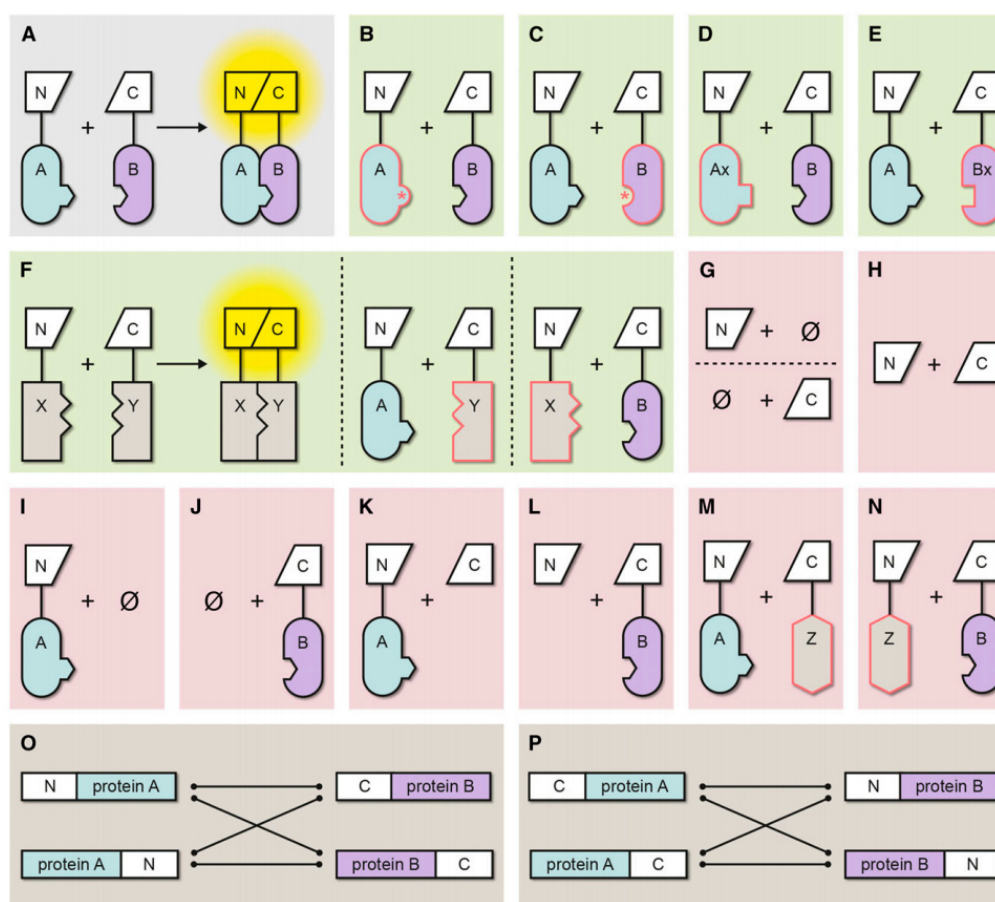


Figure 1. Summary of Possible Negative Controls in BiFC Experiments.

(1) 在一组 BiFC 实验中，最严格的控制是将其中一种蛋白质与其相互作用蛋白的突变版本结合起来(图 1b 和 1c)。理想情况下，两个蛋白互作发生所需的结构域中包含一个单点突变或一个小的缺失。由于蛋白质不稳定性或缺乏对特定蛋白质相互作用的氨基酸残基的知识，可能不总是使用突变版本的蛋白作为阴性对照(s)。在这些情况下，一个密切相关的蛋白质（例如，同一蛋白质家族的其他蛋白）可以提供同样可接受的另一种阴性对照(图 1d 和 1e)。

(2) 理想情况下，应该包括一个正对照。正对照不仅为观察到的相互作用的特异性提供了强有力的证据，还证明了相关蛋白质的进行了正确的表达和折叠。

(3) 如果突变的蛋白版本或同源蛋白都不能作为阴性对照，那么也可以使用不相关的（但理想情况下，结构相似的）的蛋白。在这种情况下，特别重要的是，所选择的蛋白质与感兴趣的蛋白质共定位于细胞的同一室（亚）室，而这种不相关的蛋白质被证明能够与另一种蛋白质相互作用(阳性对照；图 1f)。

(4) 在文献中经常看到的 BiFC 实验的不适当控制包括，例如，将一个蛋白与一个空载体结合(表达未融合的 FP 片段)或只表达一个融合蛋白(图 1G 到 1N)。此外，已知蛋白融合的方向(图

1O 和 1P)会影响 BiFC 检测中的 FP 自发重建的倾向。因此，阴性对照必须使用与正对照完全相同的方向。

三、生理实验数据处理和统计分析

选择假设检验方法的一个简单标准：符合正态分布的数据，用参数检验，比如 Student's t test；不符合正态分布的数据，用非参数检验，比如 Mann-Whitney U test。以下是常见的几种统计场景：离体叶片不定根再生实验统计，t test；RT-qPCR，t test；ChIP-qPCR，t test；愈伤组织不定芽再生，Mann-Whitney U test。

1、常见生理实验的数据统计分析

要点：（1）一次生物学实验中，至少 30 个独立个体样本；（2）至少进行三次独立生物学实验；（3）统计作图时，注意 SD (Standard deviation) 和 SEM (standard error of the mean) 的使用；（4）在图注中写清楚假设检验的方法，并在图中标出具体的 P 值。

注：SD 和 SE 都可以用于多次独立实验。SD 指标准差，表示定量个体测量值的分布情况，例如三次生物学实验重复，每次实验只有一个数值，此时计算得到 SD。SEM 指均值的标准误，表示定量样本平均数的分布情况，例如三次生物学重复实验，每次实验有多次技术重复，首先计算每次生物学实验中技术重复的平均值，得到三个平均值后再计算得到 SEM。注意：SD 和 SEM 只影响作图。

例 1，叶片再生不定根的频率

数据整理以 Excel 为例，统计分析推荐更专业的统计软件。统计一次生物学实验采用 30 片叶子；三次生物学重复。误差线为 SD。作图要求：

（1）说明实验材料的状态，培养条件，一次实验的独立群体数目，重复的生物学次数。

1、12d seedling, B5 with 2% sugar, cultured under dark condition, N=30, 三次生物学重复									
Col-0					yuc1/4				
N=30		N1	N2	N3		N1	N2	N3	
	6d	10	7	9		0	0	0	
	7d	20	18	21		0	3	3	
	8d	28	27	28		8	5	4	
	9d	29	28	30		13	15	15	
	10d	30	30	30		18	16	17	
	11d	30	30	30		23	23	20	
	12d	30	30	30		23	23	20	

(2) 计算出再生频率，而非再生的数目。

2、除以单次实验使用个体数 30，算出再生数目的百分比，即再生频率

	Col-0	N1	N2	N3	yuc1/4	N1	N2	N3
6d	0.33333333	0.23333333	0.3			0	0	0
7d	0.66666667	0.6	0.7			0	0.1	0.1
8d	0.93333333	0.9	0.93333333			0.26666667	0.16666667	0.13333333
9d	0.96666667	0.93333333	1			0.43333333	0.5	0.5
10d	1	1	1			0.6	0.53333333	0.56666667
11d	1	1	1			0.76666667	0.76666667	0.66666667
12d	1	1	1			0.76666667	0.76666667	0.66666667

(3) 计算再生频率的平均值和标准差。

利用函数 average 求平均值：

计算再生频率的平均值，利用函数 average					average	SD
6d	0.33333333	0.23333333	0.3		=AVERAGE (C48:E48)	
7d	0.66666667	0.6	0.7			
8d	0.93333333	0.9	0.93333333			
9d	0.96666667	0.93333333	1			
10d	1	1	1			
11d	1	1	1			
12d	1	1	1			

利用函数 STDEV 求标准差：

计算再生频率的平均值，利用函数 average					average	SD
6d	0.33333333	0.23333333	0.3		0.28888889	(C48:E48)
7d	0.66666667	0.6	0.7		0.65555556	
8d	0.93333333	0.9	0.93333333		0.92222222	
9d	0.96666667	0.93333333	1		0.96666667	
10d	1	1	1		1	
11d	1	1	1		1	
12d	1	1	1		1	

有关此函数的详细帮助信息

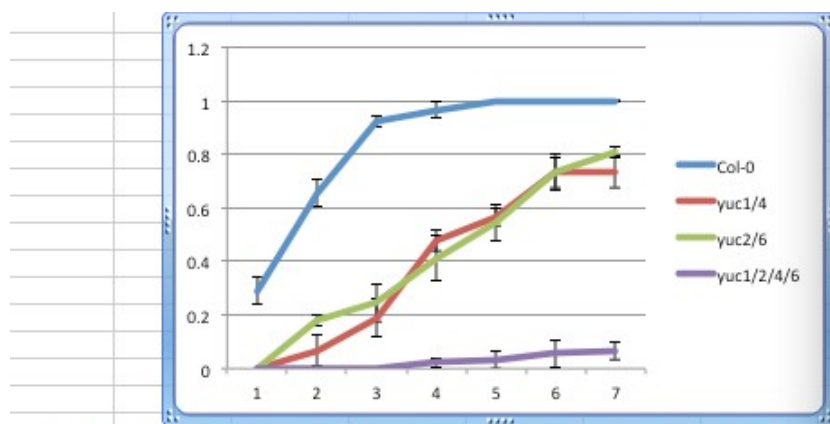
参数

STDEV

number1 C48:E48

结果: 0.050917506

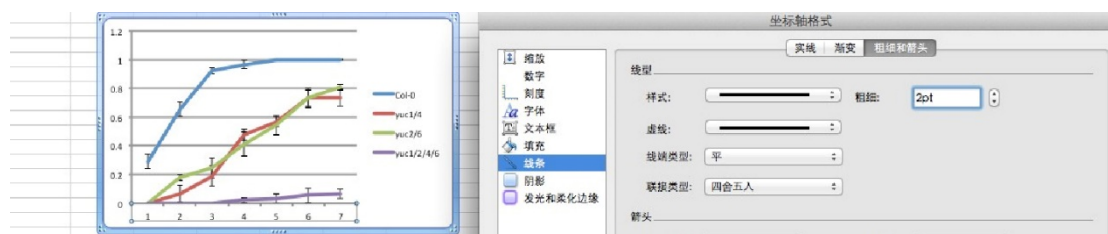
(4) 根据处理好的 average 和 SD 作图。



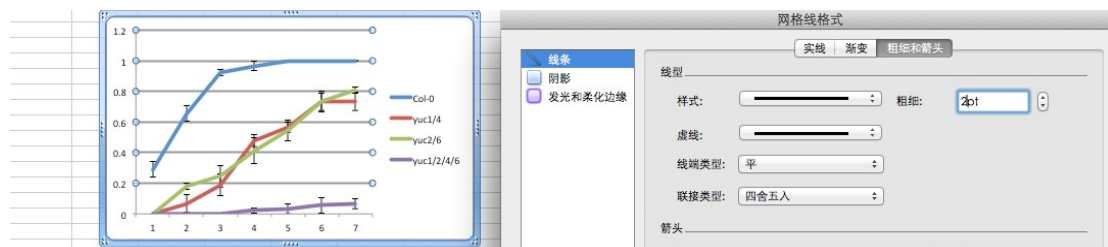
i、调整图表中线条，包括横、纵坐标，网格线以及误差线，粗细定义为 2pt

(5) 调整图表中线条,包括横、纵坐标,网格线以及误差线,粗细定义为 2pt。

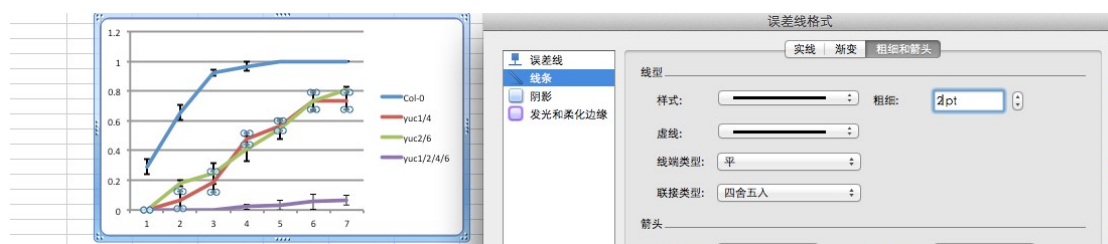
横、纵坐标:



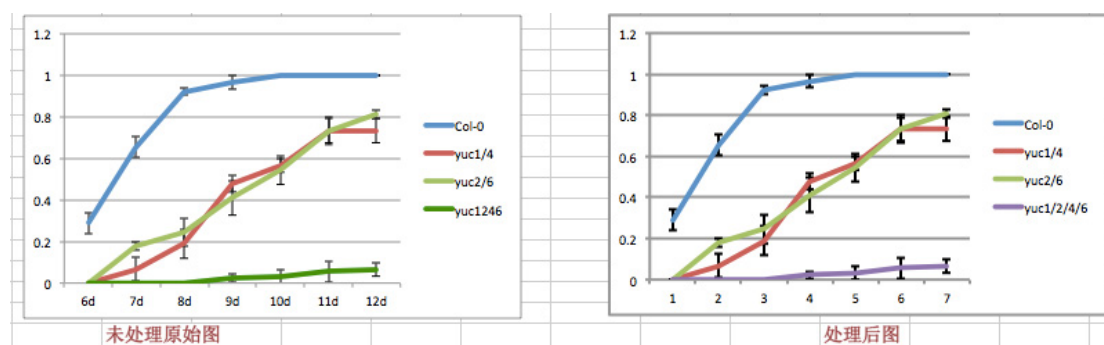
网格线:



误差线:



注: 处理前和处理后的图表对比图, 可以看到处理后的图更为清晰, 这也是文章发表对原始图片质量的要求。处理后的图片复制粘贴到 Adobe Illustrator 中得到矢量图, 保存为 PDF 文件。



例2，小苗侧根统计

由于每株小苗属于独立个体，所以理论上认为来源于每株小苗上的侧根统计为一次生物学实验。但是侧根数目差异还是比较大的，现在论文中一般进行侧根统计时，统计的个体数目一般为10，即十次生物学重复，取SD。下面以统计10棵小苗侧根数目为例来说明数据呈现要求。

(1) 输入数据，做好条件说明。

1、9d seedlings, N=10									
	Col				ref6-1				
	根长(cm)	侧根数			根长(cm)	侧根数		ref6-3	
								根长(cm)	侧根数
N1	3.51	13			3.21	9		3.01	7
N2	2.91	8			3.65	7		3.81	14
N3	2.92	9			2.75	6		2.75	6
N4	3.42	11			3.81	10		2.05	6
N5	3.49	12			3.45	9		2.21	7
N6	3.55	15			3.7	9		2.35	5
N7	3.33	12			3.4	7		3.01	4
N8	3.52	14			3.7	8		2.41	6
N9	3.49	15			3.55	9		3.25	7
N10	3.32	12			3.21	8		3.55	10

(2) 计算出每厘米侧根数目，计算average和SD。

2、总侧根数除以根长，得到每厘米侧根的数目，计算出average和SD用于作图									
	Col				ref6-1				
	根长(cm)	侧根数	侧根数/cm		根长(cm)	侧根数	侧根数/cm		
N1	3.51	13	3.7037037		3.21	9	2.80373832		
N2	2.91	8	2.74914089		3.65	7	1.91780822		
N3	2.92	9	3.08219178		2.75	6	2.18181818		
N4	3.42	11	3.21637427		3.81	10	2.62467192		
N5	3.49	12	3.43839542		3.45	9	2.60869565		
N6	3.55	15	4.22535211		3.7	9	2.43243243		
N7	3.33	12	3.6036036		3.4	7	2.05882353		
N8	3.52	14	3.97727273		3.7	8	2.16216216		
N9	3.49	15	4.29799427		3.55	9	2.53521127		
N10	3.32	12	3.61445783		3.21	8	2.49221184		
		AVERAGE	=AVERAGE(Z164:Z173)						
		SD	AVERAGE(number1; [number2]; ...)						

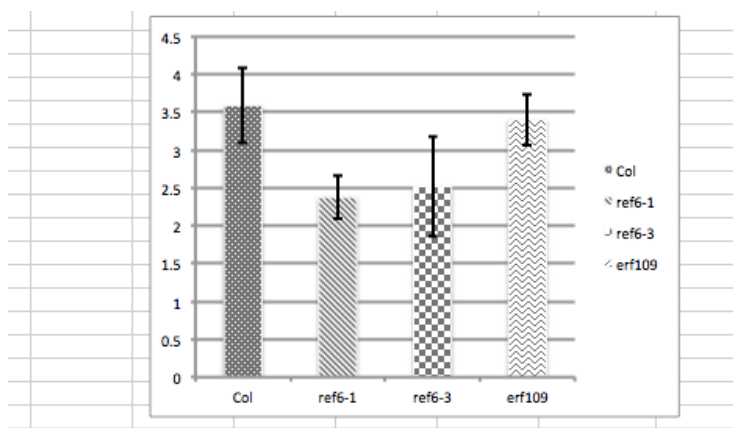
2、总侧根数除以根长，得到每厘米侧根的数目，计算出average和SD									
	Col				ref6-1				
	根长(cm)	侧根数	侧根数/cm		根长(cm)	侧根数	侧根数/cm		
N1	3.51	13	3.7037037						
N2	2.91	8	2.74914089						
N3	2.92	9	3.08219178						
N4	3.42	11	3.21637427						
N5	3.49	12	3.43839542						
N6	3.55	15	4.22535211						
N7	3.33	12	3.6036036						
N8	3.52	14	3.97727273						
N9	3.49	15	4.29799427						
N10	3.32	12	3.61445783						
		AVERAGE	3.59084866						
		SD	=STDEV(Z164:Z173)						
			STDEV(number1; [number2]; ...)						

1. TEST
POWER
TTEST
SQRT
STDEV

说明
此函数与 Excel 2008 和较早版本兼容。
估算基于给定样本的标准偏差(忽略样本中的逻辑值及文本)。
[有关此函数的详细帮助信息](#)

参数
STDEV/
number1 Z164:Z173 {3.703703703/+}
结果: 0.493975514

(3) 根据处理好的 average 和 SD 作图, 调整图表中线条, 包括横、纵坐标, 网格线以及误差线, 粗细定义为 2pt。



注: 另一种计算方法是, 一次生物学实验统计 10 条根, 取平均值, 独立统计三次, 即总共统计 30 棵小苗上的侧根数据, 此时误差线为 SEM。

2, 统计分析的规范要求。

下面这段英文描述是 Development 杂志 2016 年提出的统计规范要求。

6. Details of statistical method.

- t-test, simple x2 tests, Wilcoxon, Mann-Whitney tests and one-way and two-way ANOVA tests can be identified by name only in the figure legend. More complex tests should be described in the Materials and Methods.
- Are tests one-tailed or two-tailed?
- Are there adjustments for multiple comparisons?

由此可见, 发表性论文对于统计要求的严格性。而其中 t 检验是医学研究性论文中使用频率最高的一种统计方法。T 检验, 亦称 student t 检验, 主要用于样本含量较小 (例如 $n < 30$) 总体标准差 σ 知的正态分布资料。下面以侧根统计为例说明统计规范:

(1) t-test 前处理。

Excel 中有 T.TEST 检验的函数, 在调用这个函数对两组数据进行分析时, 我们可以发现, 有两个选择项:

第一，tails 下的选项：1 单尾 or 2 双尾。通常，双尾检验被用于没有强烈方向性期望的实验研究中，当你明确知道A数据大于B数据时，可以选择 1 单尾。当不确定其大小差异时，选双尾。一般实验中，大多选双尾。

	Col	根长 (cm)	侧根数	侧根数/cm	ref6-1	根长 (cm)	侧根数	侧根数/cm
N1		3.51	13	3.7037037		3.21	9	2.8037383
N2		2.91	8	2.74914089		3.65	7	1.91780822
N3		2.92	9	3.08219178		2.75	6	2.18181818
N4		3.42	11	3.21637427		3.81	10	2.62467192
N5		3.49	12	3.43839542		3.45	9	2.60869565
N6		3.55	15	4.22535211		3.7	9	2.43243243
N7		3.33	12	3.6036036		3.4	7	2.05882353
N8		3.52	14	3.97272727		3.7	8	2.16216216
N9		3.49	15	4.29799427		3.55	9	2.53521127
N10		3.32	12	3.61445783		3.21	8	2.49221184
		AVERAGE		3.59084866				2.38175735
		SD		0.49397552				0.28570098



第二，type下的选项。t-检验类型：1，成对检验；2，双样本等方差假设；3，双样本异方差假设。

3.21	8
range 和 SD 用于作图	
ref6-1	
根长 (cm)	侧根数
3.21	9
3.65	7
2.75	6
3.81	10
3.45	9
3.7	9
3.4	7
3.7	8
3.55	9



在进行数据分析时，应根据实验设计类型选择合适的 t 检验。若实验组和对照组进行配对，在符合配对样本 t 检验使用条件的情况下，则应该使用成对 t 检验。若实验组和对照组未进行配对，在符合独立样本 t 检验使用条件的情况下，可采用独立样本 t 检验比较两组数据的差异是否具有统计学意义。绝大多数情况下我们采用的独立样本 t 检验。当比较同一个实验对象处理前后的均值差异时，应当使用配对 t 检验，比如激素处理前后同一株拟南芥根长的变化。其中独立样本 t 检验分为两种，双样本等方差样本的比较和双样本异方差的比较。所以我们首先要对进行比较的两组数据进行方差齐性检测。

(2) 数据统计检验过程。

第一，方差齐性检测，可调用Excel中的 F-TEST函数。

Col			ref6-1		
根长(cm)	侧根数	侧根数/cm	根长(cm)	侧根数	侧根数/cm
N1	3.51	13	3.21	9	2.80373832
N2	2.91	8	3.65	7	1.91780822
N3	2.92	9	2.75	6	2.18181818
N4	3.42	11	3.81	10	2.62467192
N5	3.49	12	3.45	9	2.60869565
N6	3.55	15	3.7	9	2.43243243
N7	3.33	12	3.4	7	2.05882353
N8	3.52	14	3.7	8	2.16216216
N9	3.49	15	3.55	9	2.53521127
N10	3.32	12	3.21	8	2.49221184
AVERAGE		3.59084866			2.38175735
SD		0.49397552			0.28570098
F. TEST		64:AD173			

说明

返回 F 检验的结果, F 检验返回的是当 Array1 和 Array2 的方差无明显差异时的双尾概率。

[有关此函数的详细帮助信息](#)

参数

FTEST

array1	Z164:Z173	{3.703703703}
array2	AD164:AD173	{2.803738317}

结果: 0.11843789

F值为0.1184大于0.05, 说明两组数据方差无明显差异, 所以t-test时 要选择type2 双样本等方差检测。需要说明的是: 大多数情况, 方差基本无明显差异。

另外需要注意的是, 不论是独立样本 t 检验, 还是配对样本 t 检验, 仅适用于实验分组只有两组研究。若实验设计有多个组, 即同一实验因素下有多个分组, 则不宜反复采用。比如研究 yucasin 对再生不定根的影响时, 设置了空白组, 低剂量组和高剂量组则不宜分别采用 t 检验分别比较高剂量组与对照组、低剂量组与对照组、高剂量组与低剂量组之间的差异是否有统计学意义, 而应该采用单因素方差分析或 Kruskal-Wallis H 检验 (可用 spss) 先从总体上明确三组之间的差异是否有统计学意义, 然后根据研究需要决定是否进行两组间的比较, 采用何种方法进行比较。但是我们实验中, 大部分情况下只让实验组和对照组进行比较, 没有实验组1和实验组2之间的比较, 所以采用一般 t-test 即可。

第二, t-test 检验

Col			ref6-1		
根长(cm)	侧根数	侧根数/cm	根长(cm)	侧根数	侧根数/cm
N1	3.51	13	3.21	9	2.803738318
N2	2.91	8	3.65	7	1.917808219
N3	2.92	9	2.75	6	2.181818182
N4	3.42	11	3.81	10	2.624671916
N5	3.49	12	3.45	9	2.608695652
N6	3.55	15	3.7	9	2.432432432
N7	3.33	12	3.4	7	2.058823529
N8	3.52	14	3.7	8	2.162162162
N9	3.49	15	3.55	9	2.535211268
N10	3.32	12	3.21	8	2.492211838
AVERAGE		3.59084866			2.381757352
SD		0.49397552			0.285700979
F. TEST					
T. TEST					AD173;2;2)

说明

type 用于定义 t-检验的类型: 1 代表成对检验; 2 代表双样本等方差假设; 3 代表双样本异方差假设。

[有关此函数的详细帮助信息](#)

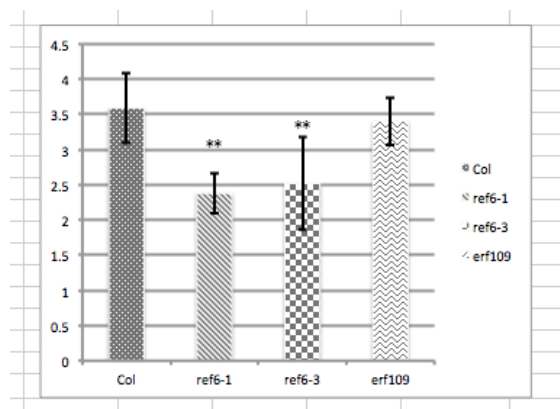
参数

TTEST

array1	Z164:Z173	{3.703703703}
array2	AD164:AD173	{2.803738317}
tails	2	2
type	2	2

结果: 2.77417E-06

可以看出 Col 与 ref6-1 两组数据检测中, t-test 小于 0.01, 差异极显著(**)。



例3，不定芽统计

适用于愈伤组织不定芽再生实验中对不同组不定芽数目差异的比较。每组要求 20 个以上的独立个体。不定芽数目的分布通常不符合正态分布，因此一般使用非参数假设检验方法，独立分组两两比较使用 Mann-Whitney U test。数据格式同例 2，目前 Excel 不支持非参数检验，因此用 R 或者 SPSS 进行检验。

四，qRT-PCR 和 ChIP-qPCR 实验规范和数据处理

1，PCR 实验设计注意加入正对照和负对照。

2，强烈建议 qPCR 实验之前，使用半定量 PCR 方法进行预实验。通常用 Actin 的引物进行半定量 PCR，设置 gDNA 对照和空白对照组。半定量 PCR 可以有效判断是否有 genomic DNA 污染、条带大小是否正确、PCR dimer 是否严重、引物是否特异、是否为“有无”的差别等。

3，Development 杂志对数据处理中强调了 error bars 只能反映独立的生物学实验，而非技术重复。一管样品的三个复孔代表了三次技术重复，所以凡是出现 qRT-PCR 的结果，都要求以三次生物学实验的数据呈现出来。此时误差线代表 SEM，因为一次生物学重复的均值来源于三次数据的平均，这会产生一个误差，所以最后求的误差为平均值的误差。

具体要求：每个 qRT-PCR（以及后面的 ChIP-qPCR）都必须是三次生物学重复的结果，每次生物学重复包含二到三次技术重复。

4，qRT-PCR 数据处理。

首先排除融解曲线不正常的样孔。

计算 qRT-PCR 中基因的相对含量：

$$\text{Relative Quantity} = 2^{-(Ct_{\text{ACTIN}} - Ct_{\text{GENE}})}$$

在real-time 程序显示页面上,我们可以将 Quantification Cq Results 这栏中的数据以Excel 的形式 copy 出来, 其中 Cq 即为我们公式中的 CT 值。下面来介绍一下具体怎么计算基因表达的相对含量, 以及如何将三次 real-time 结果整理成图表。

(1) 计算一个生物重复实验中的相对表达量:

Target	Sample	Cq	技术重复Cq平均值计算公式	技术重复Cq平均值结果	相对表达量计算公式	相对表达量计算结果
ACTIN	WT	18.82	=AVERAGE(C2:C4)	18.59333333		
ACTIN	WT	18.54				
ACTIN	WT	18.42				
ACTIN	Mutant	18.23	=AVERAGE(C5:C7)	18.19		
ACTIN	Mutant	18.25				
ACTIN	Mutant	18.09				
GENE	WT	24.21	=AVERAGE(C8:C10)	24.25	=2 ^{-(E8-E2)}	0.019823195
GENE	WT	24.22				
GENE	WT	24.32				
GENE	Mutant	25.61	=AVERAGE(C11:C13)	25.65666667	=2 ^{-(E11-E5)}	0.005653395
GENE	Mutant	25.65				
GENE	Mutant	25.71				

(2) 计算三个生物学重复的相对表达量。

重复1						
Target	Sample	Cq	技术重复Cq平均值计算公式	技术重复Cq平均值结果	相对表达量计算公式	相对表达量计算结果
ACTIN	WT	18.82	=AVERAGE(C2:C4)	18.59333333		
ACTIN	WT	18.54				
ACTIN	WT	18.42				
ACTIN	Mutant	18.23	=AVERAGE(C5:C7)	18.19		
ACTIN	Mutant	18.25				
ACTIN	Mutant	18.09				
GENE	WT	24.21	=AVERAGE(C8:C10)	24.25	=2 ^{-(E8-E2)}	0.019823195
GENE	WT	24.22				
GENE	WT	24.32				
GENE	Mutant	25.61	=AVERAGE(C11:C13)	25.65666667	=2 ^{-(E11-E5)}	0.005653395
GENE	Mutant	25.65				
GENE	Mutant	25.71				
重复2						
Target	Sample	Cq	技术重复Cq平均值计算公式	技术重复Cq平均值结果	相对表达量计算公式	相对表达量计算结果
ACTIN	WT	18.33	=AVERAGE(C18:C20)	18.36333333		
ACTIN	WT	18.36				
ACTIN	WT	18.4				
ACTIN	Mutant	18.41	=AVERAGE(C21:C23)	18.44666667		
ACTIN	Mutant	18.51				
ACTIN	Mutant	18.42				
GENE	WT	24.11	=AVERAGE(C24:C26)	24.18333333	=2 ^{-(E24-E18)}	0.017701311
GENE	WT	24.12				
GENE	WT	24.32				
GENE	Mutant	25.72	=AVERAGE(C27:C29)	25.84	=2 ^{-(E27-E21)}	0.005948191
GENE	Mutant	25.89				
GENE	Mutant	25.91				
重复3						
Target	Sample	Cq	技术重复Cq平均值计算公式	技术重复Cq平均值结果	相对表达量计算公式	相对表达量计算结果
ACTIN	WT	18.01	=AVERAGE(C33:C35)	18.08333333		
ACTIN	WT	18.03				
ACTIN	WT	18.21				
ACTIN	Mutant	17.91	=AVERAGE(C36:C38)	17.98		
ACTIN	Mutant	18.01				
ACTIN	Mutant	18.02				
GENE	WT	24.12	=AVERAGE(C39:C41)	24.17333333	=2 ^{-(E39-E33)}	0.014680043
GENE	WT	24.3				
GENE	WT	24.1				
GENE	Mutant	25.61	=AVERAGE(C42:C44)	25.65666667	=2 ^{-(E42-E36)}	0.004887571
GENE	Mutant	25.65				
GENE	Mutant	25.71				

(3) 合并三次生物学数据到一个excel中，如下图所示。计算 average，SEM，t-test。SEM 计

算公式为 $SEM = SD / \sqrt{n-1}$

Target	Sample	rep1	rep2	rep3	Mean	Mean	SD	SD	SEM	SEM
GENE	WT	0.019823	0.017701	0.01468	=AVERAGE(K9:M9)	0.017401516	=STDEV(K9:M9)	0.002585	=STDEV(K9:M9)/SQRT(3-1)	0.001828
GENE	Mutant	0.005653	0.005948	0.004888	=AVERAGE(K10:M10)	0.005496386	=STDEV(K10:M10)	0.000547	=STDEV(K10:M10)/SQRT(3-1)	0.000387

(4) t-test 计算：t-test 比较的数据也是由三次生物学重复的均值构成。

(5) 作图。

5, ChIP-qPCR 数据处理

ChIP 实验对照样品的设置组蛋白实验和转录因子实验上有所不同。组蛋白的 ChIP 可以不设置野生型样品作为对照, 以%Input 进行比较, 转录因子的 ChIP 一般需要野生型(如果用标签抗体和融合标签的转基因材料)或突变体(如果用蛋白自身抗体)作为负对照样品, 以相对富集量进行比较。

在 qPCR 检测时, 除了实验组, 即待测试的基因组位点引物, ChIP 实验需要设置的对照组包括: 阴性对照(靶蛋白可能不结合的位点, 比如 Act2, eIF4a 等, 如果是转录因子 ChIP, 还需要靶基因上的不结合位点作为阴性对照), 阳性对照(靶蛋白的已知结合位点)。

除了 IP 的样品, 无论是组蛋白还是转录因子, 都需要 input 样品 进行 qPCR 检测。

ChIP 数据处理方法与 qRT-PCR 数据大致相同。数据有两种呈现方式。

(1) 第一种方式是相对 Input 百分数 (% Input), 具体方法如下:

首先标准化目的 DNA 的量, 通常可以用 Input 为参照: $\Delta Ct [\text{normalized ChIP}] = Ct [\text{ChIP}] - Ct [\text{Input}]$

然后计算相对于 Input 的百分比: $\%Input = 2^{-(\Delta Ct [\text{normalized ChIP}])}$ 。

最后加入阴性对照。有两种方法: 其一是选取同一目的基因上没有富集的引物扩增片段; 其二是选取其他无关基因(比如 ACTIN2)。

(2) 第二种方法是将阴性对照位点(比如 Act2, eIF4a 等)的%Input 人为固定为 1.0。把实验组位点的%Input 除以该值, 得到相对富集程度。再进行实验组样品和对照组样片之间的统计分析。

上述部分的详细解释请查阅生物统计学教科书或文献, 比如: Zhang and Wen, Statistics as Part of Scientific Reasoning in Plant Sciences: Overlooked Issues and Recommended Solutions, Molecular Plant (2018), <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.11.001>

附图 1, 危险品清单。

易制爆危险化学品名录 (2017 年版)

序号	品名	别名	CAS 号
1 酸类			
1.1	硝酸		7697-37-2
1.2	发烟硝酸		52583-42-3
1.3	高氯酸 [浓度 > 72%]	过氯酸	7601-90-3
	高氯酸 [浓度 50% ~ 72%]		
	高氯酸 [浓度 < 50%]		
2 硝酸盐类			
2.1	硝酸钠		7631-99-4
2.2	硝酸钾		7757-79-1
2.3	硝酸铯		7789-18-6
2.4	硝酸镁		10377-60-3
2.5	硝酸钙		10124-37-5
2.6	硝酸锶		10042-76-9
2.7	硝酸钡		10022-31-8
2.8	硝酸镍	二硝酸镍	13138-45-9
2.9	硝酸银		7761-88-8
2.10	硝酸锌		7779-88-6
2.11	硝酸铅		10099-74-8
3 氯酸盐类			
3.1	氯酸钠		7775-09-9
	氯酸钠溶液		
3.2	氯酸钾		3811-04-9
	氯酸钾溶液		
3.3	氯酸铵		10192-29-7
4 高氯酸盐类			
4.1	高氯酸锂	过氯酸锂	7791-03-9
4.2	高氯酸钠	过氯酸钠	7601-89-0
4.3	高氯酸钾	过氯酸钾	7778-74-7
4.4	高氯酸铵	过氯酸铵	7790-98-9
5 重铬酸盐类			
5.1	重铬酸锂		13843-81-7
5.2	重铬酸钠	红矾钠	10588-01-9
5.3	重铬酸钾	红矾钾	7778-50-9
5.4	重铬酸铵	红矾铵	7789-09-5
6 过氧化物和超氧化物类			
6.1	过氧化氢溶液 (含量 > 8%)	双氧水	7722-84-1
6.2	过氧化锂	二氧化锂	12031-80-0
6.3	过氧化钠	双氧化钠; 二氧化钠	1313-60-6
6.4	过氧化钾	二氧化钾	17014-71-0
6.5	过氧化镁	二氧化镁	1335-26-8
6.6	过氧化钙	二氧化钙	1305-79-9
6.7	过氧化锶	二氧化锶	1314-18-7
6.8	过氧化钡	二氧化钡	1304-29-6
6.9	过氧化锌	二氧化锌	1314-22-3
6.10	过氧化脲	过氧化氢尿素; 过氧化氢脲	124-43-6
6.11	过乙酸 [含量 ≤ 16%, 含水 > 39%, 含乙酸 ≥ 15%, 含过氧化氢 ≤ 24%, 含有稳定剂]	过醋酸; 过氧乙酸; 乙酰过氧化氢	79-21-0
	过乙酸 [含量 ≤ 43%, 含水 > 5%, 含乙酸 ≥ 35%, 含过氧化氢 ≤ 6%, 含有稳定剂]		
6.12	过氧化二异丙苯 [52% < 含量 ≤ 100%]	二枯基过氧化物; 硫化剂 DCP	80-43-3
6.13	过氧化氢苯甲酰	过苯甲酸	93-59-4
6.14	超氧化钠		12034-12-7
6.15	超氧化钾		12030-88-5
7 易燃物还原剂类			
7.1	锂	金属锂	7439-93-2
7.2	钠	金属钠	7440-23-5

序号	品名	别名	CAS 号
7.3	钾	金属钾	7440-09-7
7.4	镁		7439-95-4
7.5	镁铝粉	镁铝合金粉	
7.6	铝粉		7429-90-5
7.7	硅铝		57485-31-1
7.8	硫磺	硫	7704-34-9
7.9	锌尘		7440-66-6
	锌粉		
7.10	金属锆		7440-67-7
	金属锆粉	锆粉	
7.11	六亚甲基四胺	六甲撑四胺; 乌洛托品	100-97-0
7.12	1, 2-乙二胺	1, 2-二氨基乙烷; 乙撑二胺	107-15-3
7.13	一甲胺 [无水]	氨基甲烷; 甲胺	74-89-5
	一甲胺溶液	氨基甲烷溶液; 甲胺溶液	
7.14	硼氢化锂	氢硼化锂	16949-15-8
7.15	硼氢化钠	氢硼化钠	16940-66-2
7.16	硼氢化钾	氢硼化钾	13762-51-1
8 硝基化合物类			
8.1	硝基甲烷		75-52-5
8.2	硝基乙烷		79-24-3
8.3	2, 4-二硝基甲苯		121-14-2
8.4	2, 6-二硝基甲苯		606-20-2
8.5	1, 5-二硝基苯		605-71-0
8.6	1, 8-二硝基苯		602-38-0
8.7	二硝基苯酚 [干的或含水 < 15%]		25550-58-7
	二硝基苯酚溶液		
8.8	2, 4-二硝基苯酚 [含水 ≥ 15%]	1-羟基-2, 4-二硝基苯	51-28-5
8.9	2, 5-二硝基苯酚 [含水 ≥ 15%]		329-71-5
8.10	2, 6-二硝基苯酚 [含水 ≥ 15%]		573-56-8
8.11	2, 4-二硝基苯酚钠		1011-73-0
9 其他			
9.1	硝化纤维素 [干的或含水 (或乙醇) < 25%]	硝化棉	9004-70-0
	硝化纤维素 [含氮 ≤ 12.6%, 含乙醇 ≥ 25%]		
	硝化纤维素 [含氮 ≤ 12.6%]		
	硝化纤维素 [含水 ≥ 25%]		
	硝化纤维素 [含乙醇 ≥ 25%]		
	硝化纤维素 [未改性的, 或增塑的, 含增塑剂 < 18%]		
9.2	硝化纤维素溶液 [含氮量 < 12.6%, 含硝化纤维素 ≤ 55%]	硝化棉溶液	831-52-7
	4, 6-二硝基-2-氨基苯酚钠	苦氨酸钠	
9.3	高锰酸钾	过锰酸钾; 灰锰氧	7722-64-7
9.4	高锰酸钠	过锰酸钠	10101-50-5
9.5	硝酸胍	硝酸亚胍	506-93-4
9.6	水合肼	水合联氨	10217-52-4
9.7	2, 2-双 (羟甲基) 1, 3-丙二醇	季戊四醇; 四羟甲基甲烷	115-77-5

附：

一， 发表论文需要签署承诺书及原始数据上传：

- 1， 论文投稿前请联系曾民环在所里备案，第一作者和通讯作者签署承诺书；
- 2， 需要提交论文相关电子版原始数据（并交给刘武统一保存）。

二， **防疫措施：**出行和长假返岗需提前报备，课题组防疫措施遵照中心要求执行。

祝各位同学实验顺利！

