

3.2 材料与方法

3.2.1 植物材料种植

烟草 *Nicotiana tabacum* L. Wisconsin 38 作为野生型, *SeNHX1* 转基因烟草为实验室保存所有(Zhou *et al.*, 2008)。PBI 空载体转化得到对照 PBI 株系, 本实验中用其 T1 代株系。本实验中所用 TS1、TS11 和 TS15, 就是 T0 代所示的 S1, S11 和 S15 (Zhou *et al.*, 2008)。

将烟草种子播种于 MS 培养基 (Murashige and Skoog, 1962), 转基因种子萌发过程中添加 150 mg ml^{-1} 卡纳霉素。2 周后, 将存活的幼苗转移至中科院植物所日光温室, 种植于塑料花盆中, 培养基质是蛭石和营养土 (1:1; v:v)。温室条件如 2 章所述。T1 代转基因株系的后代, 随机选择进行检测。

3.2.2 原生质体和液泡的分离

1g 的烟草叶片材料被裁剪成小块 ($2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$), 然后浸泡在含有 1.5% (w/v) 的离析酶, 2% (w/v) 的纤维素酶, 0.5 M 甘露醇和 25 mM Mes-KOH (pH=5.7) 的溶液中, 在 28°C 的温度下轻摇 6–8 小时 (40 rpm)。原生质体通过一层纱布过滤, 4°C 离心 $100 \times g$ 1 分钟。丢弃上清, 保存沉淀。

为了释放出液泡, 沉淀悬浮于 0.2 M 甘露醇和 25 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液中, 并每隔 2 分钟用枪吸打 5 次, 一共进行 10 分钟。悬浮液铺设至 8% (w/v) Ficoll 400 溶液 (25 mM Tris-HCl, 0.5 M 甘露醇, pH=7.2) 的顶层。平转头, 4°C , $2000 \times g$ 离心 20 分钟。取上层液面, 用显微镜观察液泡 (图 3.1)。

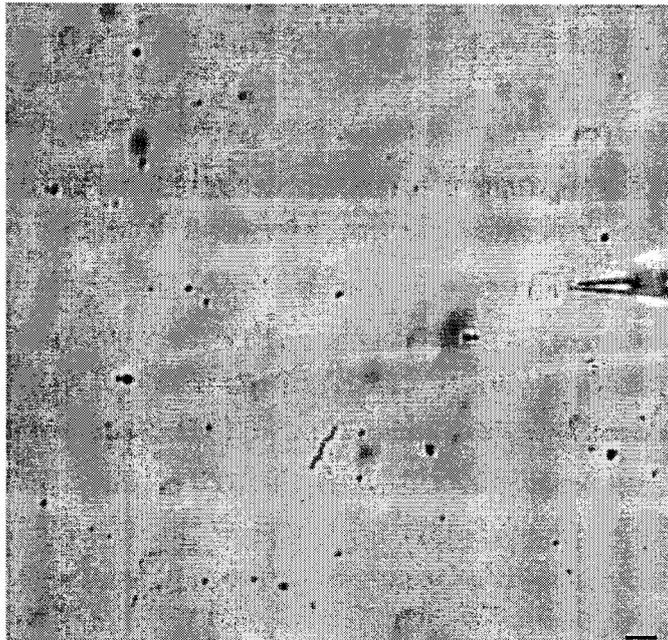


图3.1 液泡显微观察。Bar=20 μM

对照组-传统超速离心法（记作方法 M2），此方法为现有技术。

1、制备原生质体

方法与实验一中所述一致。

2、裂解原生质体

将步骤 1 得到的沉淀加入原生质体裂解缓冲液中，轻轻吸打 10 分钟，得到悬浮液；

1 升原生质体裂解缓冲液的配制方法：将 36.43 g 甘露醇和 3 g Tris 加入 1 L 水，混匀，并用 HCl 调节 pH 值至 7.5。

3、分离纯化液泡

将步骤 2 得到的悬浮液加入铺设 4 层 Ficoll-400 溶液（25 mM Tris-HCl，0.5 M 甘露醇，pH 7.5）的顶层。其中，四层不连续梯度的 Ficoll-400 浓度从上至下分别为 1.5, 7, 12.5 和 20 % (质量百分含量)。利用 BECKMAN Optima L-80XP 超速离心机，使用平转子进行 90,000 g 离心 2 h，4℃。完整的液泡带在 1.5 %和 7 % Ficoll-400 梯度界面之间，用枪吸取 1.5%和 7% Ficoll-400 梯度界面之间的溶液，即得到液泡提取液。

将上述三组实验获得的液泡，分别通过 Zeiss IM-35 倒置相差显微镜进行观测，统计通过显微镜镜头能清楚辨认的液泡数量。对于每种提取方法提取的液泡，均取 100 ul 的液泡提取液，进行检测，然后统计其中的液泡数量。将相对于 M1 方法提取所得液泡数量的倍数设定为液泡提取效率。液泡提取效率=不同方法提取所得液泡数量/M1 方法提取所得液泡数量。

3.2.3 用非损伤测定技术 (Non-Invasive Micro-Test electrophysiological Technology)测定液泡离子流

利用非损伤测定仪 (the NMT system, BIO-001A, Younger USA Sci. & Tech. Corp., Amherst, MA; Applicable Electronics Inc., Forestdale, MA and Science Wares Inc., East Falmouth, MA)（北京，旭月公司），进行测定，仪器准备与 Sun *et al.* (2009) 一致。

从 Yakult 公司购买纤维素酶（货号：L0012）与离析酶 R-10（货号：L0021）。从美国 Amresco 公司购买 SDS, MES, KOH, 甘露醇, Ficoll-400, Tris 等药品。多聚赖氨酸购买于美国 Sigma 公司（货号：P4707）。试验中所有步骤都使用双蒸水。光学显微镜使用 Zeiss IM-35 倒置相差显微镜。普通离心使用 Sigma 3-18K 离心机；超速离心使用 BECKMAN Optima L-80XP 超速离心机。

选择性的氢离子的液态交换剂（LIX）购自Sigma，产品目录号为Hydrogen ionophore I - cocktail B, 95293；