

实验设计

样品准备

- 由于非损伤微测系统十分灵敏，所以为了文章的成功发表，NMT实验材料的准备工作需要更加严谨。

1. 常见的培养方式有以下几种：

水培（液体培养基）、平板培养（固体/半固体培养基）、土/沙培。由于非损伤微测系统在测定时需要将样品维持在液体环境中，因此水培样品最易操作。

可检测的样品部位中，根部的检测经常会涉及到组培苗或是土/沙培苗。如果待测样品无法进行水培，可尝试土/沙培后再进行水培发根。这样培养的样品根部完整，避免影响测试点的选取。并且表面附着的物质也可以通过测试液平衡过程进行去除。从而保证了测试数据的稳定性和准确性。但如果只能在测试前将样品从土壤中或平板上取出，提醒您在取样时一定要小心，以免由于操作失误致使样品受到损伤，从而无法获得真实可靠的实验结果。并建议您取样时多冲洗待测样品根部并适当增加样品的平衡时间。

2. 用于非损伤微测系统检测的样品，绝大多数不需任何额外处理。但为了提升实验成功率，以下事项需要您的重视。本篇以苗期样品为例：

（1）样品苗龄：

请参考[NMT文献](#)确定检测使用的样品苗龄。

- a. 需要注意检测不同的部位（根、叶片），样品的苗龄可能不一样；
- b. 不同的实验目的（胁迫处理、营养吸收），样品的苗龄可能不一样。

（2）处理因素：

- a. 如果处理时间较长，按照正常程序处理上即可；
- b. 如果处理时间较短（数小时甚至更短），可以将样品寄送至美国扬格（旭月北京）非损伤测试中心再由工程师行处理。

（3）样品状态：

活体样品信号非常灵敏，前期的样品准备很重要！不论是培养条件、环境，还是处理条件，都要把握的十分精确，只有这样，得出可用结果的概率才会高。

（4）待测样品挑选：

待测样品需保证形态比较一致，才会更好地保证实验数据的一致性。因此建议样品数量准备充裕，并挑选一致性较强的样品进行测定。

实验设计

3. 液泡提取方法

(1) 液泡提取方法-烟草叶片

可见附件

(2) 液泡提取方法-杨树根

(2) 根原生质体

原生质体游离 原生质体游离方法参照 Shabala *et al* (1998)和 Demidchik and Tester (2002)。具体操作步骤如下：取对照和长期处理后的杨树根尖(2-3 cm)，用锋利的刀片切成 0.5 mm 左右的片段，置于 4 mL 酶解液中 (含有 10 mmol/L CaCl_2 , 2 mmol/L MgCl_2 , 2 mmol/L MES, 0.1% 牛血清白蛋白 [BSA, w/v], 330 mmol/L 甘露醇, 1.5% 纤维素酶[Cellulose, Onozuka R-10, Yakult Honsha, lot

38

3 NaCl 胁迫下杨树根细胞质膜排盐机制

no.216013], 1% 纤维素酶[Cellylysin, CalBiochem, lot no. B70487], 0.1% 果胶酶[pectolyase Y-23, Yakult Honsha, lot no. Y-007], 用 Tris 调 pH 至 5.7)。将酶解液置于摇床(避光, 60 r/min, 28℃)解离 6 h。之后, 酶解液用 50 μm 孔径的尼龙网过滤收集原生质体。组织残渣用 3 mL 储存液(含有 5 KCl, 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 10 Suc, 10 Glc, 2 MES, 330 甘露醇 [mmol/L], 用 Tris 调 pH 至 5.7) 悬浮并再次过滤来收集原生质体。将原生质体溶液离心(300g, 5min)后弃酶溶液(2 次), 最后将原生质体沉淀用 2-3 mL 储存液悬浮, 待测。

(唯一的)问答 ID: #1166

作者: xuyuenmt

更新时间: 2022-07-19 04:38