

## 钙信号

### 一、摘要

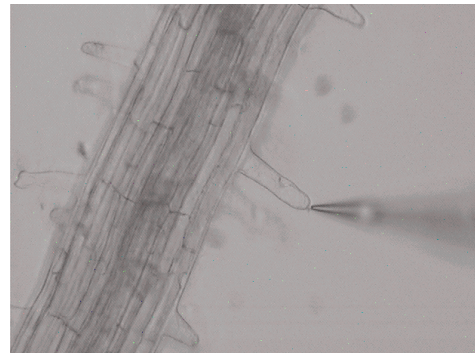
1、定量检测活体细胞、组织的实时跨膜  $\text{Ca}^{2+}$  流，验证 CNGC、GLR、OSCA、NLR、TPC 等功能

### 样品检测视频

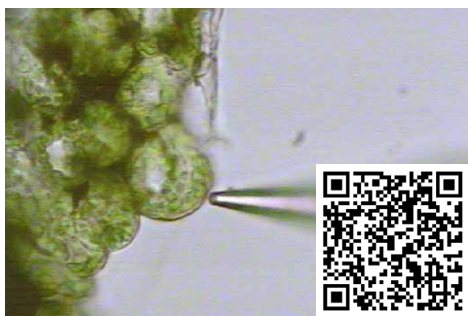
根



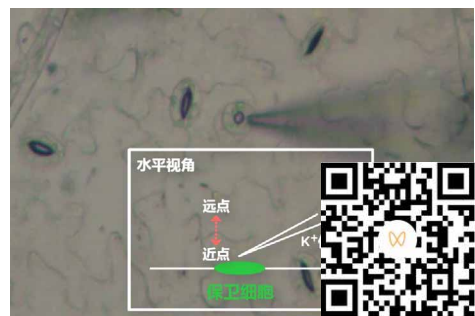
根毛



叶肉



保卫细胞



原生质体 / 液泡



扫码查看钙信号文献专辑



## 盐胁迫跨膜钙信号检测

### 经典案例

Hortic Res 江苏师大: NMT 结合根系转基因技术快速验证耐盐基因功能



扫码查看本文详细报道

Plant Cell Environ 北林陈少良:  $H_2O_2$  和  $Ca^{2+}$  调节植物盐胁迫下的  $K^+/Na^+$  平衡



扫码查看本文详细报道

### 推荐实验设备

NMT 耐盐机制分析仪 (NMT300-SMP-YG/XY)

### 实验意义

检测盐胁迫下根、茎、叶细胞的  $Ca^{2+}$  实时跨膜吸收(内流)速率

### 检测指标

$Ca^{2+}$

### 样品培养及处理

#### 苗龄

苗龄无强制要求。该实验使用苗期样品较多, 常见样品苗龄参考:

拟南芥: 1~4 周

水稻: 1~5 周

烟草: 1~3 周

杨树: 4~7 周

棉花: 1~4 周

### 培养方式

水培、琼脂培养基、土培、沙培均可, 推荐使用水培和琼脂培养, 其次是沙培和基质较松散的土培。

### 实验处理

正常培养的植物样品

### 样品选取

#### 1. 植株选取

选取状态良好且外观形态在组内占主流的植株。

#### 2. 根、叶片、茎选取

状态良好且外观较为一致。

### 检测流程

#### 前处理

1. 在 35mm 培养皿中滴入一滴测试液, 使用镊子将固定样品玻片放置到培养皿中, 并压一下玻片使其贴在皿底。

2. 吸取 100 $\mu$ L 原生质体悬液, 滴入到 35mm 培养皿中的固定样品玻片中心处, 静置 10 分钟,

3. 向培养皿中缓慢加入 4mL 测试液, 再吸出弃去。

4. 再次缓慢加入 4mL 测试液, 静置 10min。

### 样品前处理视频



扫码查看视频

### 检测过程

1. 先检测盐处理前的信号，再瞬时加入 1 mL 盐处理母液（500 mM NaCl, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 500 mM 甘露醇, 0.2 mM MES, pH5.8）后，检测处理后信号。
2. 检测位点：原生质体表面
3. 检测时长：盐处理前 5 分钟，盐处理后 10~20 分钟
4.  $n \geq 10$ ，即每组检测不少于 10 个原生质体。如同一培养皿中有多个原生质体符合检测要求，可在同一培养皿中检测不止 1 个原生质体。

### 耗材清单



扫码查看购买耗材



扫码查看实验溶液

### 检测参数

1. 物镜倍数：20 倍
2. 采样规则：X-10
3. 传感器 -- 样品表面距离：2 $\mu$ m

### 参考文献

1. 许越. 非损伤微测技术 —2022[J].NMT 通讯, 2023(01):3-9.DOI:10.5281/zenodo.8227586.
2. Zhang LD, Liu X, Wei M, et al. Ammonium has stronger Cd detoxification ability than nitrate by reducing Cd influx and increasing Cd fixation in *Solanum nigrum* L. *J Hazard Mater.* 2021 Dec 1;425:127947. doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.127947.
3. Zhu M, Li Q, Zhang Y, et al. Glycine betaine increases salt tolerance in maize (*Zea mays* L.) by regulating Na<sup>+</sup> homeostasis. *Front Plant Sci.* 2022 Sep 30;13:978304. DOI: 10.3389/fpls.2022.978304.
4. Liu J, Ma J, He C, et al. Inhibition of cadmium ion uptake in rice (*Oryza sativa*) cells by a wall-bound form of silicon. *New Phytol.* 2013, 200: 691-699. doi: 10.1111/nph.12494.

## ABA 处理下保卫细胞 $\text{Ca}^{2+}$ 信号检测

### 经典案例

Plant Cell 巩志忠: NMT 发现 ABA 促保卫细胞泌  $\text{H}^+$  (胞质碱化) 依赖于 BAK1 和 AHA2 为 AHA2 参与干旱下 ABA 诱导气孔关闭提供证据



扫码查看本文详细报道

Mol Plant 西农李积胜: NMT 发现  $\text{H}_2\text{S}$  介导 SnRK2.6 结构变化促保卫细胞吸钙诱导气孔关闭 为蛋白质翻译后修饰互作促植物抗旱提供证据



扫码查看本文详细报道

### 推荐实验设备

Physiolyzer<sup>®</sup> (NMT300-PYZ-XY)

### 实验意义

检测 ABA 处理下的  $\text{Ca}^{2+}$  实时跨膜吸收 (内流) 速率

### 检测指标

$\text{Ca}^{2+}$

### 样品培养及处理

#### 苗龄

苗龄无强制要求, 根据您的研究需求即可。该实验使用苗期样品较多。

#### 培养方式

水培、琼脂培养基、土培、沙培均可。

### 样品选取

#### 1. 植株选取

选取状态良好且外观形态在组内占主流的植株。

#### 2. 叶片选取

1) 根据您的研究需求, 选择植株上特定位置的叶片, 例如从下往上数的第 x 片叶片。部分研究可能无此要求, 同一研究的叶片选取标准需保持一致。

2) 同一组内, 叶龄、叶片颜色、大小尽量一致

3) 优先完整无损伤的叶片

### 检测流程

#### 前处理

1. 将处理后的叶片连带叶柄完整取下, 如叶片较大, 则在叶片上剪取  $1\text{cm} \times 2\text{cm}$  的叶片组织, 浸泡在缓冲溶液 ( $1.0\text{ mM MES}$ ,  $\text{pH}6.15$ ) 中,  $20000$  勒克斯光照  $90$  分钟。

2. 按照视频教程, 揭去叶片下表皮, 将透明的叶片下表皮内侧朝上, 粘在  $35\text{mm}$  培养皿底部的双面胶上。

3. 加入  $4\text{mL}$  测试液静置  $10$  分钟, 该过程持续给予  $20000$  勒克斯光照。

### 样品前处理视频



扫码查看视频

### 检测过程

1. 在载物台旁边放置光源，且持续给予培养皿中的下表皮组织 20000 勒克斯光照。
2. 选取外观完整且气孔处于较充分打开状态的保卫细胞。先检测 ABA 处理前的信号，再瞬时加入 1mL ABA 处理液母液（5× ABA, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MES, pH6.15）后，检测处理后信号。ABA 处理液母液中的 ABA 浓度，为 ABA 处理终浓度的 5 倍。该实验常用 ABA 终浓度为 10~50 μM。
3. 检测位点：保卫细胞表面
4. 检测时长：ABA 处理前 5 分钟， ABA 处理后 10-20 分钟
5. 重复数：n≥10，即每组检测不少于 10 个保卫细胞。如同一株样品有多片叶片符合检测要求，可在同一株上取不止 1 片叶片，也可在同一叶片上取不止 1 块下表皮组织，还可在同一块下表皮组织上测不止 1 个保卫细胞。一组实验使用的植株数不可少于 3 株。

### 耗材清单



扫码查看购买耗材



扫码查看实验溶液

### 检测参数

1. 物镜倍数：20 倍
2. 采样规则：Z-10
3. 传感器 -- 样品表面距离：2μm

### 参考文献

1. 许越. 非损伤微测技术 —2022[J].NMT 通讯, 2023(01):3-9.DOI:10.5281/zenodo.8227586.
2. Yang M, He J, Sun Z, et al. Drought priming mechanisms in wheat elucidated by in-situ determination of dynamic stomatal behavior. *Front Plant Sci.* 2023 Feb 17;14:1138494. DOI: 10.3389/fpls.2023.1138494.
3. Chen S, Wang X, Jia H, et al. Persulfidation-induced structural change in SnRK2.6 establishes intramolecular interaction between phosphorylation and persulfidation. *Mol Plant.* 2021 Jul 6:S1674-2052(21)00268-9. DOI: 10.1016/j.molp.2021.07.002.
4. Pei D, Hua D, Deng J, et al. Phosphorylation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase AHA2 by BAK1 is required for ABA-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2022 Apr 11:koac106. doi: 10.1093/plcell/koac106.

## 干旱胁迫下植物根 $\text{Ca}^{2+}$ 信号检测

### 经典案例

Ind Crop Prod 海大 & 广东海大: NMT 从  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  流角度 为探究石斛 CIPK24 促耐盐旱机制提供证据



扫码查看本文详细报道

J Exp Bot 西北研究院: NMT 发现 FAD3 通过亚麻酸调节  $\text{Ca}^{2+}$  信号增强烟草对多重胁迫的耐受性



扫码查看本文详细报道

### 推荐实验设备

Physiolyzer<sup>®</sup> (NMT300-PYZ-XY)

### 实验意义

检测干旱胁迫下的  $\text{Ca}^{2+}$  实时跨膜吸收 (内流) 速率

### 检测指标

$\text{Ca}^{2+}$

### 样品培养及处理

#### 苗龄

苗龄无强制要求。该实验使用苗期样品较多, 常见样品苗龄参考:

拟南芥: 1~4 周

水稻: 1~5 周

烟草: 1~3 周

杨树: 4~7 周

棉花: 1~4 周

### 培养方式

水培、琼脂培养基、土培、沙培均可, 推荐使用水培和琼脂培养, 其次是沙培和基质较松散的土培。

### 样品选取

#### 1. 植株选取

选取状态良好且外观形态在组内占主流的植株。

#### 2. 根选取

1) 主根或侧根均可, 同一研究需保持一致, 即都是主根或都是侧根

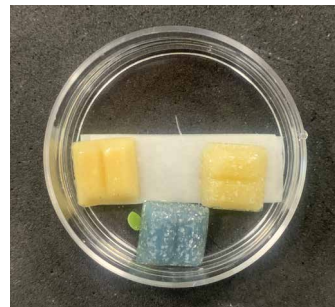
2) 同一组内, 根长、根直径、根颜色尽量一致

3) 优先新生根或嫩根

### 检测流程

#### 前处理

1. 将样品取出, 使用滤纸条和样品固定专用树脂块将样品的一条根, 按压固定在培养皿底部。体积较小样品, 可整株置于培养皿中; 如体积较大, 剪取目标根并固定好



根样品固定

2. 加入测试液浸没根, 静置 30min, 不同规格的培养皿对应加入测试液体积:

35/60/90 mm 培养皿, 分别对应 4/10/40 mL 测试液。

### 样品前处理视频



扫码查看视频

### 检测过程

1. 先检测 PEG 处理前的信号，再瞬时加入 1mL PEG 处理液母液（5x PEG, 1.0 mM NaCl, 0.1 mM KCl, 0.1mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2 mM MES, pH5.8）后，检测处理后信号。PEG 处理液母液中的 PEG 浓度，为 PEG 处理终浓度的 5 倍。该实验常用 PEG 终浓度为 10~20%。
2. 检测位点：根分生区。距离根尖顶点 2d 的位置，d= 根直径
3. 检测时长：PEG 处理前 5 分钟，PEG 处理后 10-20 分钟
4. 重复数：n≥8，即每组检测不少于 8 条根。如同一株样品有多条根符合检测要求，可在同一株上取不止 1 条根，一组内使用的植株数不可少于 3 株

### 耗材清单



扫码查看购买耗材



扫码查看实验溶液

### 检测参数

1. 物镜倍数：4 倍（根直径 ≥200μm）；10 倍（根直径 < 200μm）
2. 采样规则：X-30
3. 传感器 -- 样品表面距离：5μm

### 参考文献

1. 许越 . 非损伤微测技术 —2022[J].NMT 通讯 ,2023(01):3-9.DOI:10.5281/zenodo.8227586.
2. Zhou Y, Liu J, Guo J, et al. GmTDN1 improves wheat yields by inducing dual tolerance to both drought and low-N stress. *Plant Biotechnol J.* 2022 May 5. doi: 10.1111/pbi.13836.
3. Feng X, Liu W, Qiu C, et al. HvAKT2 and HvHAK1 confer drought tolerance in barley through enhanced leaf mesophyll H<sup>+</sup> homeostasis. *Plant Biotechnol J.* 2020 Aug;18(8):1683-1696. doi: 10.1111/pbi.13332.
4. Xiao Y, Huang X, Shen Y, et al. A novel wheat α-amylase inhibitor gene, TaHPS, significantly improves the salt and drought tolerance of transgenic Arabidopsis. *Physiol Plant.* 2013 Jun;148(2):273-83. doi: 10.1111/j.1399-3054.2012.01707.x.

## 干旱胁迫下植物叶肉 $\text{Ca}^{2+}$ 信号检测

### 经典案例

Plant Biotechnol J 浙大陈仲华、邬飞波: HvAKT2 和 HvHAK1 通过增强叶肉  $\text{H}^+$  稳态提升耐旱能力



扫码查看本文详细报道

### 推荐实验设备

Physiolyzer<sup>®</sup> (NMT300-PYZ-XY)

### 实验意义

检测干旱胁迫下的  $\text{Ca}^{2+}$  实时跨膜吸收 (内流) 速率

### 检测指标

$\text{Ca}^{2+}$

### 样品培养及处理

#### 苗龄

苗龄无强制要求。该实验使用苗期样品较多, 常见样品苗龄参考:

拟南芥: 1~4 周

水稻: 1~5 周

烟草: 1~3 周

杨树: 4~7 周

棉花: 1~4 周

#### 培养方式

水培、琼脂培养基、土培、沙培均可。

### 样品选取

#### 1. 植株选取

选取状态良好且外观形态在组内占主流的植株。

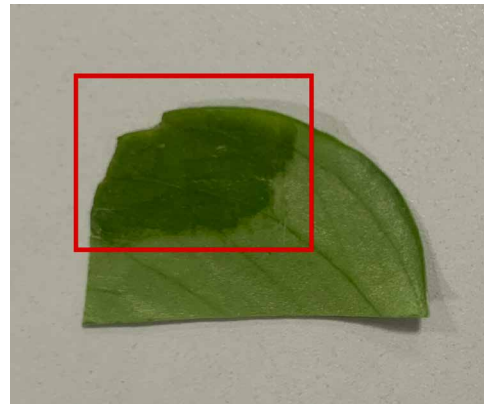
#### 2. 叶片选取

- 1) 根据您的研究需求, 选择植株上特定位置的叶片, 例如从下往上数的第  $x$  片叶片。部分研究可能无此要求, 同一研究的叶片选取标准需保持一致。
- 2) 同一组内, 叶龄、叶片颜色、大小尽量一致
- 3) 优先完整无损伤的叶片

### 检测流程

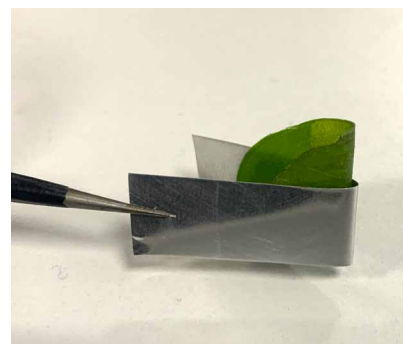
#### 前处理

1. 从目标叶片上剪取  $1\text{cm} \times 1\text{cm}$  的叶片组织, 揭去叶片组织的下表皮, 暴露叶肉组织。如果叶片面积较小, 直接用整片叶片。



叶片暴露叶肉组织

2. 对折叶片, 叶片下表面朝外, 让暴露出叶肉组织处于外侧弯折面处, 使用铝箔条将远离弯曲面的叶片组织条尾部夹住, 使用样品固定专用树脂块将样品压在培养皿底部, 露出叶片弯折处的叶肉组织。







叶肉细胞样品固定

3. 加入测试液浸没叶片，静置 2 小时，不同规格的培养皿对应加入测试液体积：

35/60/90 mm 培养皿，分别对应 4/10/40 mL 测试液

#### 样品前处理视频



扫码查看视频

#### 检测过程

1. 先检测 PEG 处理前的信号，再瞬时加入 1mL PEG 处理液母液（5xPEG, 1.0 mM NaCl, 0.1 mM KCl, 0.1mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2 mM MES, pH5.8）后检测处理后信号。PEG 处理液母液中的 PEG 浓度，为 PEG 处理终浓度的 5 倍。该实验常用 PEG 终浓度为 10~20%。

2. 检测位点：叶肉细胞表面

3. 检测时长：PEG 处理前 5 分钟，PEG 处理后 10-20 分钟

4. 重复数：n≥8，即每组检测不少于 8 块叶片组织。如同一株样品有多片叶片符合检测要求，可在同一株上取不止 1 片叶片，也可在同一片叶片上取不止 1 块叶片组织，一组实验使用的植株数不可少于 3 株。

#### 耗材清单



扫码查看购买耗材



扫码查看实验溶液

#### 检测参数

1. 物镜倍数：4 倍
2. 采样规则：X-30
3. 传感器 -- 样品表面距离：5μm

#### 参考文献

1. 许越 . 非损伤微测技术 —2022[J].NMT 通讯 ,2023(01):3-9.DOI:10.5281/zenodo.8227586.
- 2.Li B, Zhang M, Sun W, et al. N6-methyladenosine RNA modification regulates cotton drought response in a Ca<sup>2+</sup> and ABA-dependent manner. Plant Biotechnol J. 2023 Mar 22. doi: 10.1111/pbi.14036.
- 3.Feng X, Liu W, Qiu C, et al. HvAKT2 and HvHAK1 confer drought tolerance in barley through enhanced leaf mesophyll H<sup>+</sup> homeostasis. Plant Biotechnol J. 2020 Aug;18(8):1683-1696. doi: 10.1111/pbi.13332.

## 低温胁迫下根实时 $\text{Ca}^{2+}$ 信号检测

### 经典案例

Cell 种康：无损“电生理”钙流为揭示水稻感知寒害的分子机制提供直接证据



扫码查看本文详细报道

Mol Plant 万建民院士：无损“电生理” $\text{Ca}^{2+}$ 流作为膜通道功能核心验证手段 为揭示 CNGC9 通道调控水稻低温响应机制提供证据



扫码查看本文详细报道

### 推荐实验设备

Physiolyzer<sup>®</sup> (NMT300-PYZ-XY)

### 实验意义

检测干旱胁迫下的  $\text{Ca}^{2+}$  实时跨膜吸收（内流）速率

### 检测指标

$\text{Ca}^{2+}$

### 样品培养及处理

#### 苗龄

苗龄无强制要求。该实验使用苗期样品较多，常见样品苗龄参考：

拟南芥：1~4 周

水稻：1~5 周

烟草：1~3 周

杨树：4~7 周

棉花：1~4 周

### 培养方式

水培、琼脂培养基、土培、沙培均可，推荐使用水培和琼脂培养，其次是沙培和基质较松散的土培。

### 样品选取

#### 1. 植株选取

选取状态良好且外观形态在组内占主流的植株。

#### 2. 根选取

1) 主根或侧根均可，同一研究需保持一致，即都是主根或都是侧根

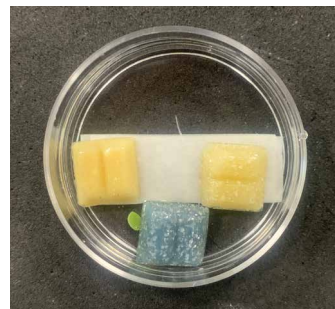
2) 同一组内，根长、根直径、根颜色尽量一致

3) 优先新生根或嫩根

### 检测流程

#### 前处理

1. 将样品取出，使用滤纸条和样品固定专用树脂块将样品的一条根，按压固定在培养皿底部。体积较小样品，可整株置于培养皿中；如体积较大，剪取目标根并固定好



根样品固定

2. 加入测试液浸没根，静置 30min，不同规格的培养皿对应加入测试液体积：

35/60/90 mm 培养皿，分别对应 4/10/40 mL 测试液

### 样品前处理视频



扫码查看视频

### 检测过程

1. 先检测低温 (4-10°C) 处理前的信号, 再更换低温处理测试液, 继续检测瞬时低温下的信号
2. 检测位点: 根分生区。距离根尖顶点 2d 的位置, d= 根直径
3. 检测时长: 低温处理前 5 分钟, 低温处理后 10-20 分钟
4. 重复数:  $n \geq 8$ , 即每组检测不少于 8 条根。如同一株样品有多条根符合检测要求, 可在同一株上取不止 1 条根, 一组内使用的植株数不可少于 3 株。

### 耗材清单



扫码查看购买耗材



扫码查看实验溶液

### 检测参数

1. 物镜倍数: 4 倍 (根直径  $\geq 200\mu\text{m}$ ); 10 倍 (根直径  $< 200\mu\text{m}$ )
2. 采样规则: X-30
3. 传感器 -- 样品表面距离:  $5\mu\text{m}$

### 参考文献

1. 许越. 非损伤微测技术 —2022[J].NMT 通讯, 2023(01):3-9.DOI:10.5281/zenodo.8227586.
2. Ma Y, Dai X, Xu Y, et al. COLD1 confers chilling tolerance in rice. Cell. 2015 Mar 12;160(6):1209-21. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.046.
3. Wang J, Ren Y, Liu X, et al. Transcriptional Activation and Phosphorylation of OsCNGC9 Confer Enhanced Chilling Tolerance in Rice[J]. Mol Plant. 2021 Feb 1;14(2):315-329. doi: 10.1016/j.molp.2020.11.022.
4. Li Z, Khan MU, Letuma P, et al. Transcriptome Analysis of the Responses of Rice Leaves to Chilling and Subsequent Recovery. Int J Mol Sci. 2022 Sep 15;23(18):10739. DOI: 10.3390/ijms231810739.

## 低温胁迫下叶肉实时 $\text{Ca}^{2+}$ 信号检测

### 经典案例

Nat Plants 林鸿宣院士：“无损电生理”跨膜  $\text{Ca}^{2+}$  流为 G 蛋白通过钙信号调节蜡质合成进而调控水稻耐热性提供证据



扫码查看本文详细报道

### 推荐实验设备

Physiolyzer<sup>®</sup> (NMT300-PYZ-XY)

### 实验意义

检测低温胁迫下的  $\text{Ca}^{2+}$  实时跨膜吸收（内流）速率

### 检测指标

$\text{Ca}^{2+}$

### 样品培养及处理

#### 苗龄

苗龄无强制要求。该实验使用苗期样品较多，常见

样品苗龄参考：

拟南芥：1~4 周

水稻：1~5 周

烟草：1~3 周

杨树：4~7 周

棉花：1~4 周

#### 培养方式

水培、琼脂培养基、土培、沙培均可。

### 样品选取

#### 1. 植株选取

选取状态良好且外观形态在组内占主流的植株。

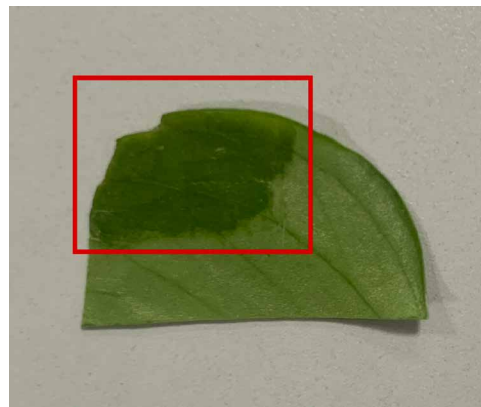
#### 2. 叶片选取

- 1) 根据您的研究需求，选择植株上特定位置的叶片，例如从下往上数的第 x 片叶片。部分研究可能无此要求，同一研究的叶片选取标准需保持一致。
- 2) 同一组内，叶龄、叶片颜色、大小尽量一致
- 3) 优先完整无损伤的叶片

### 检测流程

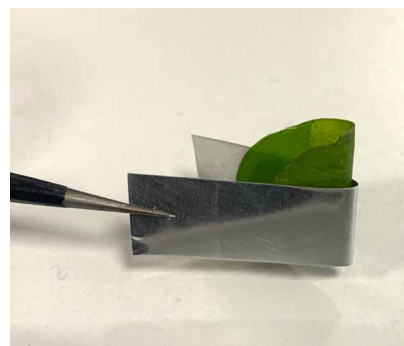
#### 前处理

1. 从目标叶片上剪取 1cm\*1cm 的叶片组织，揭去叶片组织的下表皮，暴露叶肉组织。如果叶片面积较小，直接用整片叶片。



叶片暴露叶肉组织

2. 对折叶片，叶片下表面朝外，让暴露出叶肉组织处于外侧弯折面处，使用铝箔条将远离弯曲面的叶片组织条尾部夹住，使用样品固定专用树脂块将样品压在培养皿底部，露出叶片弯折处的叶肉组织。



doi:10.5281/zenodo.10258471



叶肉细胞样品固定

3. 加入测试液浸没叶片，静置 2 小时，不同规格的培养皿对应加入测试液体积：

35/60/90 mm 培养皿，分别对应 4/10/40 mL 测试液

#### 样品前处理视频



扫码查看视频

#### 检测过程

1. 先检测低温（4-10℃）处理前的信号，再更换低温处理测试液，继续检测瞬时低温下的信号。
2. 检测位点：叶肉细胞表面
3. 检测时长：低温处理前 5 分钟，低温处理后 10-20 分钟
4. 重复数：n≥8，即每组检测不少于 8 块叶片组织。如同一株样品有多片叶片符合检测要求，可在同一株上取不止 1 片叶片，也可在同一片叶片上取不止 1 块叶片组织，一组实验使用的植株数不可少于 3 株。

#### 耗材清单



扫码查看购买耗材



扫码查看实验溶液

#### 检测参数

1. 物镜倍数：4 倍
2. 采样规则：X-30
3. 传感器 -- 样品表面距离：5μm

#### 参考文献

1. 许越. 非损伤微测技术 —2022[J].NMT 通讯, 2023(01):3-9.DOI:10.5281/zenodo.8227586.
2. Chen F, Dong G, Wang F, et al. A  $\beta$ -Ketoacyl carrier protein reductase confers heat tolerance via the regulation of fatty acid biosynthesis and stress signaling in rice. *New Phytol.* 2021 Jul 14. doi: 10.1111/nph.17619.
3. Yan Y, Sun M, Ma S, et al. Mechanism of CsGPA1 in regulating cold tolerance of cucumber, *Horticulture Research*, 2022;, uhac109, <https://doi.org/10.1093/hr/uhac109>

## 植物根模式免疫 (PTI) 实时 $\text{Ca}^{2+}$ 信号检测

### 推荐实验设备

Physiolyzer<sup>®</sup> (NMT300-PYZ-XY)

### 实验意义

检测植物模式免疫过程中的  $\text{Ca}^{2+}$  实时跨膜吸收 (内流) 速率。

### 检测指标

$\text{Ca}^{2+}$

### 样品培养及处理

#### 苗龄

苗龄无强制要求。该实验使用苗期样品较多, 常见样品苗龄参考:

拟南芥: 1~4 周

水稻: 1~5 周

烟草: 1~3 周

杨树: 4~7 周

棉花: 1~4 周

#### 培养方式

水培、琼脂培养基、土培、沙培均可, 推荐使用水培和琼脂培养, 其次是沙培和基质较松散的土培。

### 样品选取

#### 1. 植株选取

选取状态良好且外观形态在组内占主流的植株。

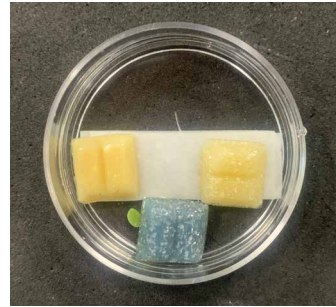
#### 2. 根选取

- 1) 主根或侧根均可, 同一研究需保持一致, 即都是主根或都是侧根
- 2) 同一组内, 根长、根直径、根颜色尽量一致
- 3) 优先新生根或嫩根

### 检测流程

#### 前处理

1. 将样品取出, 使用滤纸条和样品固定专用树脂块将样品的一条根, 按压固定在培养皿底部。体积较小样品, 可整株置于培养皿中; 如体积较大, 剪取目标根并固定好。



根样品固定

2. 加入测试液浸没根, 静置 30min, 不同规格的培养皿对应加入测试液体积:  
35/60/90 mm 培养皿, 分别对应 4/10/40 mL 测试液

#### 样品前处理视频



扫码查看视频

### 检测过程

1. 先检测 Flg22 处理前的信号, 再瞬时加入 1mL Flg22 处理液母液 (5x Flg22, 1.0 mM NaCl, 0.1 mM KCl, 0.1mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.2 mM MES, pH5.8) 后检测处理后信号。Flg22 处理液母液中的 Flg22 浓度, 为 Flg22 处理终浓度的 5 倍。该实验常用 Flg22 终浓度为 0.01~10  $\mu\text{M}$ 。

2. 检测位点：根分生区。距离根尖顶点  $2d$  的位置， $d$ = 根直径
3. 检测时长：Flg22 处理前 5 分钟，Flg22 处理后 10-20 分钟
4. 重复数： $n \geq 8$ ，即每组检测不少于 8 条根。如同一株样品有多条根符合检测要求，可在同一株上取不止 1 条根，一组内使用的植株数不可少于 3 株

### 耗材清单



扫码查看购买耗材



扫码查看实验溶液

### 检测参数

1. 物镜倍数：4 倍（根直径  $\geq 200\mu\text{m}$ ）；10 倍（根直径  $< 200\mu\text{m}$ ）
2. 采样规则：X-30
3. 传感器 — 样品表面距离： $5\mu\text{m}$

### 参考文献

1. 许越. 非损伤微测技术 —2022[J].NMT 通讯, 2023(01):3-9.DOI:10.5281/zenodo.8227586.
2. Luo X, Wang Z, Wang C, et al. Nanomaterial Size and Surface Modification Mediate Disease Resistance Activation in Cucumber (*Cucumis sativus*). ACS Nano. 2023 Mar 14;17(5):4871-4885. doi: 10.1021/acsnano.2c11790.

## 植物叶肉模式免疫 (PTI) 实时 $\text{Ca}^{2+}$ 信号检测

### 经典案例

Nature 东英吉利大学 Zipfel: 无损“电生理”钙流为气孔免疫钙通道 OSCA1.3 的鉴定提供关键证据



扫码查看本文详细报道

Cell Res 万建民院士: 无损“电生理”钙流为 CNGC9 介导 PAMP 激活钙通道促水稻抗病提供关键证据



扫码查看本文详细报道

### 推荐实验设备

Physiolyzer<sup>®</sup> (NMT300-PYZ-XY)

### 实验意义

检测植物模式免疫过程中的  $\text{Ca}^{2+}$  实时跨膜吸收 (内流) 速率。

### 检测指标

$\text{Ca}^{2+}$

### 样品培养及处理

#### 苗龄

苗龄无强制要求。该实验使用苗期样品较多, 常见样品苗龄参考:

拟南芥: 1~4 周

水稻: 1~5 周

烟草: 1~3 周

杨树: 4~7 周

棉花: 1~4 周

### 培养方式

水培、琼脂培养基、土培、沙培均可。

### 样品选取

#### 1. 植株选取

选取状态良好且外观形态在组内占主流的植株。

#### 2. 叶片选取

1) 根据您的研究需求, 选择植株上特定位置的叶片, 例如从下往上数的第 x 片叶片。部分研究可能无此要求, 同一研究的叶片选取标准需保持一致。

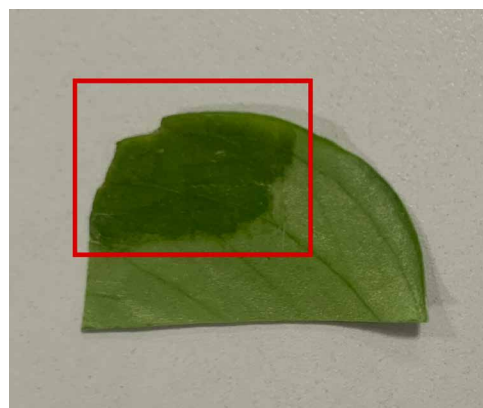
2) 同一组内, 叶龄、叶片颜色、大小尽量一致

3) 优先完整无损伤的叶片

### 检测流程

#### 前处理

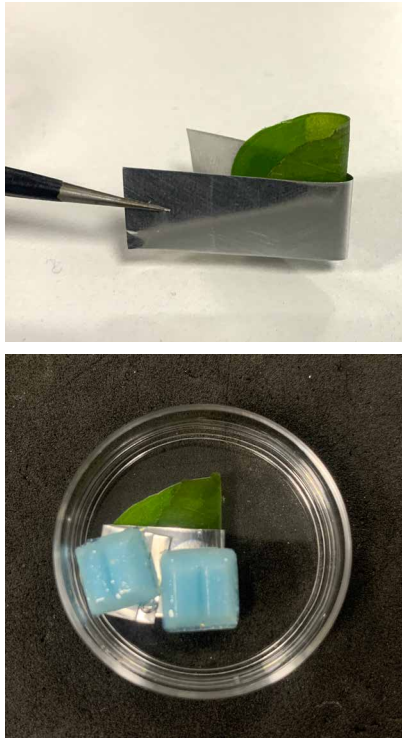
1. 从目标叶片上剪取 1cm\*1cm 的叶片组织, 揭去叶片组织的下表皮, 暴露叶肉组织。如果叶片面积较小, 直接用整片叶片。



叶片暴露叶肉组织



2. 对折叶片，叶片下表面朝外，让暴露出叶肉组织处于外侧弯折面处，使用铝箔条将远离弯曲面的叶片组织条尾部夹住，使用样品固定专用树脂块将样品压在培养皿底部，露出叶片弯折处的叶肉组织。



叶肉细胞样品固定

3. 加入测试液浸没叶片，静置 2 小时，不同规格的培养皿对应加入测试液体积：  
35/60/90 mm 培养皿，分别对应 4/10/40 mL 测试液

#### 样品前处理视频



扫码查看视频

#### 检测过程

1. 先检测 Flg22 处理前的信号，再瞬时加入 1mL Flg22 处理液母液（5x Flg22, 1.0 mM NaCl, 0.1 mM KCl, 0.1mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2 mM MES, pH5.8）后检测处

理后信号。Flg22 处理液母液中的 Flg22 浓度，为 Flg22 处理终浓度的 5 倍。该实验常用 Flg22 终浓度为 0.01~10 μM。

2. 检测位点：叶肉细胞表面

3. 检测时长：Flg22 处理前 5 分钟，Flg22 处理后 10-20 分钟

4. 重复数：n≥8，即每组检测不少于 8 块叶片组织。如同一株样品有多片叶片符合检测要求，可在同一株上取不止 1 片叶片，也可在同一叶片上取不止 1 块叶片组织，一组实验使用的植株数不可少于 3 株。

#### 耗材清单



扫码查看购买耗材



扫码查看实验溶液

#### 检测参数

1. 物镜倍数：4 倍
2. 采样规则：X-30
3. 传感器 -- 样品表面距离：5μm

#### 参考文献

1. 许越. 非损伤微测技术 —2022[J].NMT 通讯, 2023(01):3-9.DOI:10.5281/zenodo.8227586.
2. Guo S, Zhang Y, Li M, et al. TaBln1, a member of the Blufensin family, negatively regulates wheat resistance to stripe rust by reducing Ca<sup>2+</sup> influx. *Plant Physiol.* 2022 Mar 14;kiac112. doi: 10.1093/plphys/kiac112.
3. Yu X, Xie Y, Luo D, et al. A phospho-switch constrains BTL2-mediated phyto cytokine signaling in plant immunity. *Cell.* 2023 May 25;186(11):2329-2344.e20. doi: 10.1016/j.cell.2023.04.027.