

## 亚细胞定位和 BiFC 步骤

亚细胞定位和 BiFC 步骤参考冷泉港实验手册 (Von Arnim, 2007)。

- (1) 称取 5 mg 金粉到 1.5 ml 离心管中;
- (2) 加入 1 ml 70%乙醇, 涡旋 5 min;
- (3) 静至 15 min;
- (4) 10000 rpm 离心 5 min, 去上清;
- (5) 加入 1 ml 无菌水, 涡旋 1 min, 离心 1 min, 去上清, 重复步骤 3-4 次;
- (6) 质粒 2  $\mu$ g, 2.5 M CaCl<sub>2</sub> 20  $\mu$ l, 0.1 M 亚精胺 8  $\mu$ l, 加入金粉管中, 冰上放置 20 min, 期间每 5 min 涡旋一次 (亚细胞定位加入一种质粒, BiFC 实验加入两种质粒);
- (7) 加入 80  $\mu$ l 100%乙醇, 13000g 离心 20 s, 去上清;
- (8) 加 30 $\mu$ l 100%乙醇, 涡旋后加 170  $\mu$ l 100%乙醇, 离心 20 s;
- (9) 重复步骤 (3) 4 次;
- (10) 加 6  $\mu$ l 100%乙醇悬浮, 涡旋后进行基因枪操纵, 用基因枪轰击洋葱。
- (11) 洋葱处理: 将洋葱表皮切成若干个 1 cm<sup>2</sup> 的小块, 用无菌水浸泡, 再用无菌滤纸吸干表面液体, 将洋葱表皮贴在高渗培养基上培养一晚上, 第二天将洋葱表皮转移到 MS 固体培养基上培养 3-4h, 用于基因枪轰击。
- (12) 基因枪轰击后暗培养 16h, 将洋葱表皮撕下, 在激光共聚焦下观察是否有荧光发生。

附: MS 高渗培养基 PH:5.8

7.5g 蔗糖

2.5g 琼脂粉

18.2g 山梨醇

容至 250 ml

用 MS 母液以及自来水定容至 250 ml

亚精胺需现配现用。

MS 培养基 PH:5.8

7.5g 蔗糖

2.5g 琼脂粉

用 MS 母液以及自来水定