



中科瑞泰(北京)生物科技有限公司

Real-Times(Beijing)Biotechnology Co.,Ltd

Tel:400-699-0631 <http://www.real-times.com.cn>



扫描二维码打开中科瑞泰官网
www.real-times.com.cn



欢迎关注“中科瑞泰”

我们提供优质的
植物研究试剂盒
完善的售后服务

www.real-times.com.cn
400-699-0631

植物原生质体制备及转化试剂盒

| 货号 | 名称 | 包装 |
|---------|----------------|------------|
| RTU4052 | 植物原生质体制备及转化试剂盒 | 5 ml × 40次 |

● 产品组成:

| 组份货号 | 名称 | 规格 | 贮存 |
|------------|-----------------|--------|------|
| RTU4052-01 | 溶液I-酶溶解溶液 (2×) | 100 ml | -20℃ |
| RTU4052-02 | 溶液II-漂洗溶液 | 200 ml | -20℃ |
| RTU4052-03 | 溶液III-重悬溶液 | 25 ml | -20℃ |
| RTU4052-04 | 溶液IV-转化试剂 | 5 ml | -20℃ |
| RTU4052-05 | 溶液V-培养溶液 | 25 ml | -20℃ |
| BME | 还原剂 | 1 ml | RT |
| BSA-02 | BSA溶液 (50mg/ml) | 5 ml | -20℃ |

● 产品简介:

植物原生质体是指脱去全部细胞壁由质膜包被的具有生命活力的裸露细胞。它具有细胞生命特征和全能型，是细胞无性系变异和突变体筛选的重要来源，同时也是植物遗传工程的理想受体和遗传改良的理想材料。酶解法分离原生质体是一个常用的技术，其原理是植物细胞壁主要由纤维素、半纤维素和果胶质组成，因而使用纤维素酶、半纤维素酶、离析酶和果胶酶能降解细胞壁成分，去除细胞壁，即可得到原生质体。许多方法可诱导原生质体融合，现在被广泛采用的融合方法是聚乙二醇(PEG)法。聚乙二醇(PEG)作为一种高分子化合物，合适的浓度能对原生质体产生瞬间冲击效应，原生质体很快发生收缩与粘连，随后用高钙高pH法进行清洗，使原生质体融合得以完成。

按照每次使用5 ml酶消化体系计算，本试剂盒可用于40次酶消化反应。本试剂盒每个5 ml反应体系可处理0.1 g左右的拟南芥叶片(约10~15叶片)，操作较好的情况下每5 ml体系可获得约50-70万个原生质体(不同植物不同操作会有一些的差异)，可满足约25-70个样品的原生质体质粒转染操作(按照每样1-2万个细胞计算)。

原生质体转化时，按照每次转化100μl原生质体溶液，转化试剂可以完成至少40个样品的转化。

● 贮存和运输:

-20℃保存，至少一年有效。

组分I, II, III, V 4℃存放3-5天不会影响使用效果，长期不用，按照标签温度贮存。

试剂盒常温运输。

Ver.710170

注：本制品仅供科研用。请勿用于人体及动物的医疗、临床诊断或作为食品、化妆品、家庭用品的添加剂等用途。
中科瑞泰(北京)生物科技有限公司 电话:400-699-0631 E-mail:real-times@vip.163.com <http://www.real-times.com.cn>

● 使用说明:

需要准备的材料 (试剂盒不提供):

剪尖吸头 (剪尖后可以用酒精灯过火将吸头处理平滑); 纤维素酶R-10; 离析酶R-10; 平头镊子; 70 μm细胞过滤筛; 一次性刀片; 50 ml离心管; 1.5 ml离心管; 水浴锅。

一、原生质体分离:

即用型酶溶液配制

| 组份 | 5 ml配制量 | 10 ml配制量 |
|-------------|---|----------|
| 溶液I (2×) | 2.5 ml | 5 ml |
| 纤维素酶R-10 | 0.075 克 | 0.15 克 |
| 离析酶R-10 | 0.02 克 | 0.04 克 |
| | 混匀后 55°C 水浴 10 min, 期间颠倒混匀 2-3次, 冷却至常温后加入以下成分。注: 55°C 孵育可以有效灭活DNase和Protease, 并促进酶溶解。 | |
| BME | 2.5 μl | 5 μl |
| 50mg/ml BSA | 0.1 ml | 0.2 ml |
| 灭菌水 | 定容至5 ml | 定容至10 ml |

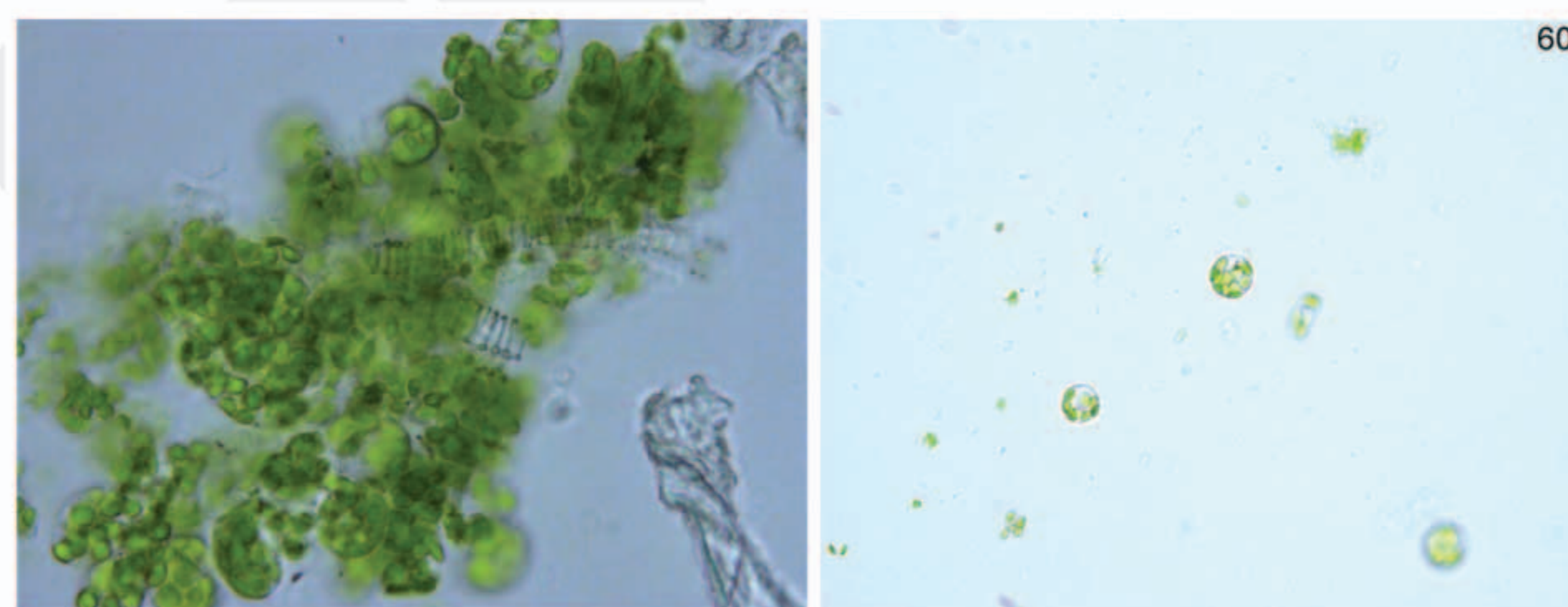
注: 即用型酶溶液现用现配, 不建议配制后冻存后再使用; 溶解好的正常酶溶液应为澄清棕黄色溶液 (右图), 如使用纯度不好的酶, 溶液为不溶解的乳白色悬浊液, 不能使用。



1.1 酶解:

取生长状态良好的叶片切成0.5-1 mm的小条, 按照0.1 克叶片 (拟南芥约15-20个叶片) 加5 ml 即用型酶溶液的比例迅速将切割好的叶片小条浸泡于酶溶液中, 避光, 无需震荡, 常温(20-25°C) 酶解3小时, 间歇混匀。

注: 酶解时间与叶片种类, 叶片生长状态有关, 请根据实验需要适当调整酶解时间。3小时为拟南芥叶片推荐的酶解时间。如条件允许, 可以使用微型真空泵常温避光条件下抽真空30 min, 以使酶溶液更好地进入细胞间隙。酶溶液变为绿色表明有原生质体已经有分离, 溶液为浓绿色表明原生质体已经大量分离(左下图)。拟南芥原生质体大小约为30-50 μm, 显微镜镜检后确定是否分离。叶片原生质体细胞显微镜下为绿色圆球状, 叶绿体分散在整个细胞内(右下图), 说明状态较好; 如呈现不规则形状, 说明原生质体破碎或即将破碎。



荷花叶片原生质体



1.2 漂洗:

酶解后加入等体积的溶液II, 如使用5 ml酶解体系, 加入5 ml溶液II, 轻柔混匀。

1.3 过滤:

用孔径70 μm筛网(自备)过滤步骤2中的溶液, 去除未消化的叶片, 用5-10 ml溶液II冲洗酶解器皿和未消化的叶片1-2次, 将所有的液体收到50 ml离心管中。

1.4 第一次收集:

滤出液 100 g 常温离心 2分钟, 尽量去除上清。

注: 为了避免原生质体离心时贴在管壁, 建议整个实验过程使用水平转头; 离心时, 可调低离心机的升速和降速。升速过快, 原生质体可能离到管壁上; 降速过快, 可能导致管底原生质体悬起。建议升速和降速分别都使用3。

1.5 第二次收集:

加入2-5 ml 溶液II, 用剪尖的蓝吸头重悬原生质体, 冰浴30分钟, 原生质体在重力作用下可以沉降到离心管底部, 尽量吸除上清, 收集原生质体。(如果发现原生质体沉降的速度比较慢或者得率比较低, 也可以考虑常温100 g离心1-2 min收集原生质体)。

1.6 重悬:

小心去除上清溶液, 不要触动原生质体沉淀, 沉淀用剪尖的蓝吸头重悬于1 ml溶液III中即为原生质体溶液。(可以用血球计数板计数, 根据原生质体数量调整溶液III的加入体积, 使得原生质体密度为 2×10^5 /ml或更高)。

注: 制备好的原生质体可以在4°C或冰浴保存至少24 h。

二、原生质体转化和培养:

2.1 转化溶液配制:

植物原生质体转化参考下表根据样品量配制转化溶液。

| | 120 μl(1个样品) | 1.2 ml(10个样品) | 5 ml(40个样品) |
|-------------|--------------|---------------|-------------|
| 转化试剂粉末 | 48 mg | 480 mg | 2 g |
| 转化试剂溶解液(2×) | 60 μl | 600 μl | 2.5 ml |
| 灭菌水 | 定容至120 μl | 定容至1.2 ml | 定容至5 ml |

注: 转化溶液现用现配。转化溶液需要在转化前至少1小时配制, 以确保转化试剂溶解充分。转化溶液配制后尽量当天使用。配制好的转化溶液4°C保存3-5天之内仍然有较好的转化效率, 但和当天配制的转化溶液相比, 转化效果可能会有一定程度的下降。

2.2 准备质粒:

取10 μl质粒DNA(10-20 μg, 浓度为1-2 μg/μl)于1.5 ml 离心管中。

注: 质粒大小建议为5-10 kb, 质粒浓度为1-2 μg/μl左右;

原生质体转化对于质粒的纯度要求较高, 尽量使用高纯度的质粒。

2.3 质粒转化:

2.3.1 质粒管中加入100 μl原生质体溶液(原生质体密度为 2×10^5 /ml, 约2万个原生质体), 轻柔混匀。

2.3.2 加入等体积即110 μl 步骤1事先准备好的转化溶液, 轻弹管底, 混匀, 常温25°C放置5-15分钟。

注: 最长可以孵育15 min, 但通常孵育5 min时间已经足够。最佳的孵育时间对于不同的原生质体和不同的质粒需要通过实验摸索。

2.4 终止转化:

加入2倍体积即440 μl 溶液II, 轻柔彻底混匀, 终止转化过程。

2.5 收集原生质体:

常温 100 g 离心1-2分钟, 尽量去除上清。

注: 由于转化后的溶液会非常粘稠, 加入溶液II后离心1 min通常可以使原生质体聚集在管底, 但使用某些突变体时为减少原生质体损失, 可将离心时间延长到2 min。

2.6 原生质体漂洗:

加入500 μ l溶液II轻轻重悬原生质体, 常温100g离心1 min, 尽量去除残留的上清。

注: 本步骤可以充分去除残留的转化试剂溶液中的组分, 避免转化试剂溶液中的组分对于后续的不良影响。

2.7 原生质体重悬:

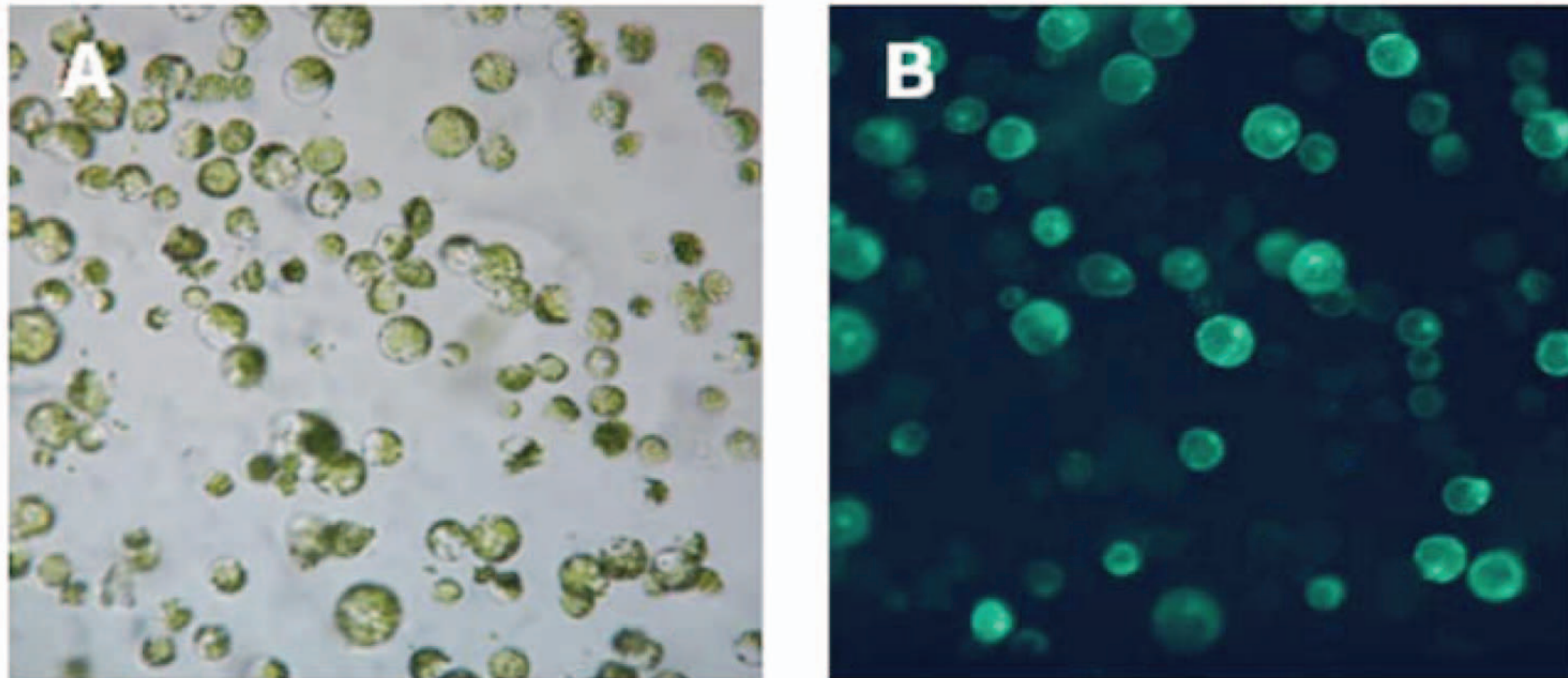
沉淀中加入1 ml溶液V, 轻柔重悬。

2.8 原生质体培养:

将离心管水平放置, 23-25 $^{\circ}$ C弱光培养。

注: 根据实验需求确定孵育时间。RNA分析孵育2-6小时; 酶活性分析和蛋白标记实验孵育2-16小时; 基因编辑的效果在转染24小时后可能被检测到。

三、实验示例:



使用植物原生质体制备及转化试剂盒转染拟南芥原生质体的效果图。

实验步骤:

称取480 mg转化试剂于2 ml 离心管中, 加入转化试剂溶解液后, 颠倒混匀, 蒸馏水定容至1.2 ml, 使转化试剂充分溶解后备用。在2 ml的圆底离心管中加入10 μ l (20 μ g) EGFP质粒(植物用绿色荧光蛋白), 加入100 μ l制备好的原生质体, 轻柔混匀后加入110 μ l当日配制好的转化试剂溶液, 轻柔混匀, 常温静置5 min后加入440 μ l溶液II终止转化, 轻轻颠倒混匀, 常温100 g离心1 min, 去除上清, 再加入500 μ l溶液II, 轻柔重悬原生质体, 常温100 g离心1 min后, 尽量去除上清, 收集原生质体。加入1 ml溶液V, 小心重悬原生质体后水平放置25 $^{\circ}$ C培养过夜(约16h), 次日于荧光显微镜下检测EGFP荧光信号。

四、发表文章:

1. TaEXPB7-B, a β -expansin gene involved in low-temperature stress and abscisic acid responses, promotes growth and cold resistance in *Arabidopsis thaliana*.

Xu Feng, Yongqing Xu, Lina Peng, Xingyu Yu, Qiaoqin Zhao, Shanshan Feng, Ziyi Zhao, Fenglan Li, Baozhong Hu,

J Plant Physiology 2019, Vol.249, 153004.

2. Involvement of the chloroplast gene ferredoxin 1 in multiple responses of *Nicotiana benthamiana* to Potato virus X infection.

Xue Yang, Yuwen Lu, Fang Wang, Ying Chen, Yanzhen Tian, Liangliang Jiang, Jiejun Peng, Hongying Zheng, Lin Lin, Chengqi Yan, Michael Taliansky, Stuart MacFarlane, Yuanhua Wu, Jianping Chen and Fei Yan.

Journal of Experimental Botany, 2020, Vol.71, No. 6, 2142–2156.