



## 马铃薯原生质体制备与转化试剂盒（20 mL/T）

### 产品内容:

|     | 组分编号     | 产品内容                    | 规格 (5T)  | 储存温度  |
|-----|----------|-------------------------|----------|-------|
| A 盒 | R45818-1 | 酶解缓冲液 EC1 (Buffer EC 1) | 110 mL   | -20°C |
|     | R45818-2 | 酶解缓冲液 EC2 (Buffer EC 2) | 8 mL     |       |
|     | R45818-3 | 酶 E 1 (Enzyme 1)        | 1.8 g    |       |
|     | R45818-4 | 酶 E3 (Enzyme 3)         | 0.3 g    |       |
| B 盒 | R45818-5 | 培养液 CM (Buffer CM)      | 100 mL×6 | 2-8°C |
|     | R45818-6 | 分离液 MP (Buffer MP)      | 60 mL    |       |
|     | R45818-7 | 重悬液 RS (Buffer RS)      | 15 mL    |       |
|     | R45818-8 | 转化液 TP (Buffer TP)      | 18 mL    |       |
|     | R45818-9 | 细胞筛                     | 5 个      |       |
|     |          | 说明书                     | 1 份      |       |

### 运输及储存条件:

A 盒为蓝冰运输, B 盒为常温运输; 收货后应将 A 盒避光保存于 -20°C, B 盒保存于 2-8°C; 本试剂盒溶液易污染, 建议开封后立即使用; 试剂盒组分未开封的有效期为 18 个月。

### 产品介绍:

本试剂盒主要通过酶的消化作用, 酶解植物细胞壁获得原生质体。适用于从马铃薯叶片中分离和转化原生质体。获得的原生质体可用于蛋白的亚细胞定位, 验证蛋白间的相互作用, 转录因子的转录调控等实验。

### 产品特点:

本试剂盒包含原生质体制备和转化需要的全部试剂, 按照每次 20 mL 酶解液的使用量, 可供 5 次原生质体制备以及 120 个转化反应。

### 注意事项:

1. 分离制备的原生质体没有细胞壁的保护, 非常脆弱, 整个实验操作过程中动作尽可能轻柔。



2. 实验过程中尽可能使用切过尖的枪头，保证切口平滑，可减少原生质体破裂。
  3. 若无水平转子，可适当调整离心力、离心时间、升降速，以保证实验成功。
  4. 转化时建议添加空载荧光对照（例如 pBI221-EGFP），以验证操作步骤无问题。
  5. 本试剂盒经过多次质检，可确保实验的稳定性。若实验员为首次实验，建议进行预实验以熟练操作流程。
- 在每步后进行镜检，观察原生质体状态，以自检实验操作流程。
6. 请使用去内毒素质粒进行转化。

**操作步骤：**（在开始操作前请先阅读注意事项）

#### 一、准备工作

##### 1. 需要自行准备的材料

锋利刀片；血球计数板；50 mL 圆底离心管；2 mL 离心管，切过尖的灭菌蓝枪头和黄枪头，10  $\mu$ L 白枪头。

##### 2. 酶解液配制

| 配制顺序 | 组分                                                           | 20 mL 体积    |
|------|--------------------------------------------------------------|-------------|
| 第一步  | 酶解缓冲液 EC1（Buffer EC 1），                                      | 19 mL       |
|      | 使用前可 55℃ 水浴融化，冷却至室温使用                                        |             |
|      | 酶 E1（Enzyme 1）                                               | 0.3 g       |
|      | 酶 E3（Enzyme 3）                                               | 0.02 g      |
| 第二步  | 混匀后 55 °C 水浴 10 min，期间颠倒混匀 2-3 次。<br>随后于室温静置，待其冷却至室温后，加入以下成分 |             |
| 第三步  | 酶解缓冲液 EC2（Buffer EC 2）                                       | 200 $\mu$ L |
| 第四步  | 使用酶解缓冲液 EC1（Buffer EC 1）定容                                   |             |
| 第五步  | 过滤除菌（可选步骤）                                                   |             |

注：

1. 酶解液必须现配现用，根据实验的需要选择酶解液是否需要过滤除菌。

#### 二、原生质体的分离制备

1. 准备马铃薯材料，取材以 30 d 内的幼嫩真叶为优。

2. 取 5-10 片（约 1 g）叶片，用锋利刀片平行主叶脉，切成 0.5-1.0 mm 的细条。

3. 将切好的细条放入装有 20 mL 酶解液的 50 mL 容积的小烧杯中，锡箔纸包裹。

注：避光步骤可防止原生质体的光合作用，有氧呼吸释放的活性氧可能不利于原生质体生存。

4. 避光 28 °C，45 rpm/min 摇床上孵育 4 h。

5. 用 1 mL 培养液 CM 润洗细胞筛。

6. 将酶解后的产物用细胞筛过滤，用镊子或无菌枪头尾部轻轻挤压酶解物帮助其充分释放原生质体，此时肉眼可见浓绿色液体滴落（挤压步骤十分重要）。用 5 mL 培养液 CM 冲洗酶解器皿和未消化的叶片 2 次（使用切过尖的蓝枪头冲洗），将所有液体收集至 50 mL 圆底离心管中。

注：操作过程尽可能轻柔，避免剧烈震荡，过滤时可以将 50 mL 离心管倾斜 70°，缓冲溶液下落时产生的碰撞力，防止原生质体破碎。

7. 用切尖枪头，取一滴酶解液进行镜检。若在 100×视野中可观察到圆形的原生质体，则可继续进行实验。

若视野内原生质体大量破碎或皱缩发黑，则弃去。

8. 选用水平转子，室温 800 rpm 离心 5 min，升速 3，降速 3，去上清（管中绿色沉淀即为原生质体）。

注：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导致破碎；降速过快，可能导致管底原生质体悬起。

9. 向上述沉淀中加入 5 mL 培养液 CM 温柔重悬位于底部原生质体（切过尖的蓝枪头），备用。

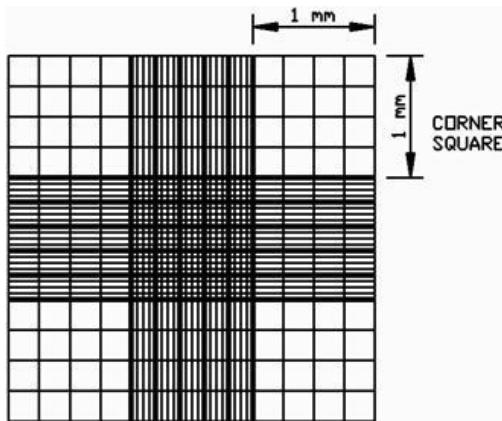
10. 将 10 mL 分离液 MP 加入新的 50 mL 圆底离心管后，将第 9 步液体缓慢的放在分离液 MP 上。此时可观察到上层为绿色原生质体，下层为无色分离液 MP。

11. 将上述液体室温 800 rpm 离心 5 min，升速 3，降速 3。缓慢拿取并吸取位于中间环带的原生质体，约 3mL 于新的 50 mL 圆底离心管中。

12. 向上述液体中加入 5 mL 培养液 CM，室温 800 rpm 离心 5 min，升速 3，降速 3，去除上清。

注：在离心前，可以显微镜下观察原生质体的状态和血球计数板计数。血球计数板的使用：

如下图所示，在血球计数板上盖玻片，分别从两侧凹槽加入样品。使用中央区域长和宽都是 1 mm 的方形区域进行计数（25 个中方格）。分别统计正方形四个顶角和中央的小正方形的细胞数量，取平均值再乘以 25（正方形被分成了 25 个小正方形），计算该区域的细胞数量，该区域的体积为 0.1  $\mu\text{L}$ （长 1 mm，宽 1 mm，高 0.1 mm）。计算获得的细胞数量，原生质体浓度（个/mL）= 25 个中方格原生质体数  $\times 10^4 \times$  稀释倍数。



13. 在上述沉淀中加入 1 mL 培养液 CM，用切尖蓝枪头转移至 2 mL 圆底离心管中。800 rpm 离心 3 min，升速 3，降速 3，去上清，用相应体积的重悬液 RS 重悬原生质体，调整原生质体密度为  $2 \times 10^5/\text{mL}$ 。（根据细胞数量和所需反应数，加入对应的重悬液 RS 体积，100  $\mu\text{L}/1$  个反应）

### 三、原生质体的转化

1. 在 2 mL 灭菌圆底离心管中加入 5-20  $\mu\text{g}$ （总体积不超过 10  $\mu\text{L}$ ）纯化后的高质量质粒（去内毒素），随后加入 100  $\mu\text{L}$  上述重悬后的原生质体，轻弹混匀，42°C 水浴 5 min。

2. 向上述溶液加入 110  $\mu\text{L}$  的转化液 TP，颠倒混匀，室温避光孵育 15 min。请注意严格控制孵育时间。

注：去内毒素质粒对转化效率有极明显提升（近 3 倍），建议购买 PE036 去内毒素质粒大提试剂盒（吸附柱法）。原生质体与转化液 TP 较难混匀，请耐心等待操作，以至充分混匀，保证转化效率。

3. 加入 1 mL 培养液 CM，轻柔颠倒混匀，终止转化。室温 800 rpm 离心 3 min，升速 3，降速 3，在不损失原生质体的情况下，尽可能去上清。

4. 加入 1 mL 培养液 CM 重悬原生质体，室温 800 rpm 离心 3 min，升速降速 3，去上清。

#### 四、原生质体的培养和收集

1. 加入 1 mL 培养液 CM 培养悬浮细胞，此时可取样镜检，观察原生质体状态。随后将离心管于室温水平避光放置，孵育 12-16 h。

2. 收集细胞时，缓慢拿起离心管，用切尖枪头将附着在管壁上的细胞轻轻悬起，室温 800 rpm 离心 3 min，升速 3，降速 3，去除大部分培养液 CM，收集原生质体，用于后续实验。

可选：用 1 mL 酶解缓冲液 EC2 润洗细胞培养板后，将 1 mL 培养液 CM 加入细胞培养板备用。将 1 mL 培养液 CM 重悬原生质体，将其加入上述细胞培养板中，室温过夜培养。

**保质期：**18个月

源叶