

拟南芥原生质体制备及转化试剂盒使用说明

(2019 第 1 版)

产品编号: PPT101 (由 A 盒和 B 盒组成)

储存条件: A 盒, -20℃ 储存; B 盒, 常温储存。

产品组成:

组份编号		组分名称	10T	20T	储存温度
A 盒	PPT101-1	溶液 I	80 mL	80 mL×2	-20 °C
	PPT101-2	Cellulose R10	1.5g	3g	
	PPT101-3	Macerozyme R10	0.35g	0.7g	
	PPT101-4	BSA (10%)	2.5 mL	5 mL	
	PPT101-5	AMP (100 mg/mL)	1 mL	1 mL	
B 盒	PPT101-6	溶液 II-W5 solution	100 mL×2	100 mL×4	RT
	PPT101-7	溶液 III-MMg solution	10mL	10 mL×2	
	PPT101-8	溶液 IV-PEG solution	5 mL	10 mL	
	PPT101-9	还原剂 (β-me)	100 μL	200 μL	
	PPT101-10	细胞筛	10 片	20 片	
说明书			1 份		

产品简介:

本试剂盒主要通过纤维素酶和离析酶配制的酶解液消化植物细胞壁获得原生质体。适用于短日照培养的拟南芥植株或者在培养皿生长的拟南芥幼苗中分离原生质体。获得的细胞可用于蛋白的亚细胞定位, 验证蛋白间的相互作用, 研究蛋白的转录调控等。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 10 mL 酶解液的使用量, 可供 20 次实验。

使用说明:

一、准备工作

1. 需要准备的材料（本试剂盒不提供）：

锋利刀片；血球计数板；50 mL 离心管；2 mL 离心管

2. 即用型酶解液配制

配制顺序	组分	10 mL 体积	20 mL 体积
第一步	溶液 I	8 mL	16 mL
	Cellulose R10	0.15 g	0.3g
	Macerozyme R10	0.03 g	0.06 g
第二步	混匀后 55°C 水浴 10min，期间颠倒混匀 2-3 次，冷却室温后加入以下成分		
第三步	BSA (10%)	100 μ L	200 μ L
	β -巯基乙醇（选加）	3.57 μ L	7.14 μ L
	Amp（选加）	5 μ L	10 μ L
第四步	加去离子水定容		
第五步	过滤除菌（可选步骤）		

注：根据实验的需要选择酶解液是否需要过滤除菌，**在三小时内游离原生质体**无需加入 β -巯基乙醇，Amp 和过滤除菌。

二、原生质体的分离制备

1. 取短日照温室条件下培养约 4 周未抽苔的拟南芥叶片（取其完全展开的叶片），优选第 2、3 和 4 对叶片；或在培养皿中生长 10 天左右的拟南芥幼苗。（建议每株顶端及以下 3 片叶子为材料，留部分叶柄方便镊子夹取，其余不要。）

2. 在超净工作台中用灭菌刀片将叶片横向（平行主叶脉）切成 0.5-1.0 mm（实际宽度）的细条（去掉主叶脉），置于含有 10 mL 混好的酶解液中（培养皿），避光室温 40 rpm 摇床摇动约 3 h，直至大部分叶片长条呈现透明，说明基本酶解完毕（肉眼可见培养皿中有浓绿色溶液浸出）。

注 1：切叶片时可以将 3-5 片叶叠在一起，不要过多，避免拖拽，以防破坏原生质体。10-20 个叶片在 5-10 mL 的酶液中能产生大约 $0.5-1 \times 10^6$ 个原生质体（转化每个质粒需要 $1-2 \times 10^4$ 个细胞）。

注 2：根据实验目的不同，需要的细胞也有差异。研究蛋白的亚细胞定位或者通过 BiFC 方法验证蛋白间的相互作用，需要 10^3-10^4 个细胞；分析基因的启动子，根据启动子的强度和所选用的报告基因的不同，大概需要 100-1000 个细胞；研究蛋白的表达和通过 Co-IP 方法验证蛋白间的相互作用，需要 10^4-10^5 个细胞；从原生质体中提取 RNA 大概需要 10^5 个细胞。

3. 收集原生质体前，80 rpm 摇床摇动 1-5 分钟，让原生质体彻底释放出来（可以每隔 5 分钟用手轻轻晃动 3-5 次）。

注：黄化苗酶解后原生质体不呈绿色，酶解完成后，可以取一滴酶解液镜检，如果细胞圆而发亮，则健康，继续往下做；如果细胞扁且发黑，则弃去。

4. 酶解后的产物用细胞筛过滤，用镊子或无菌枪头轻轻夹取酶解物帮助充分释放原生质体，去除未消化的叶片组织，用 10 mL 溶液 II-W5 solution 冲洗酶解器皿和未消化的叶片 2-3 次，将所有的液体收到 50 mL 离心管中。

注：由于原生质体在制备过程中极易破碎，操作过程中应尽可能动作要轻柔，避免剧烈震荡，防止原生质体破碎。

5. 选用水平转头，100 g 离心 2 min，升速 3，降速 3，去除上清。

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；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。

6. 用 5 mL 预冷的溶液 II-W5 solution 轻柔重悬位于底部的原生质体，用剪尖的蓝枪头轻轻将原生质体悬起，100 g 离心 1 min，升速 3，降速 3，弃去上清。

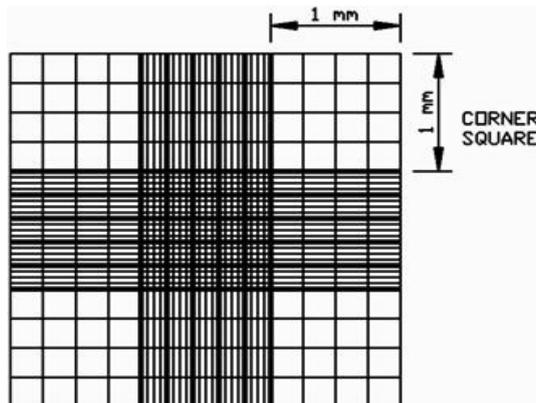
7. 加入 5 mL 预冷的溶液 II-W5 solution，重悬原生质体，冰上孵育 30 min。

8. 显微镜下观察原生质体的状态并用血球计数板进行计数。

注：如原生质体呈现圆球形，叶绿体分散在整个细胞内，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。

血球计数板的使用：

如下图所示，在血球计数板上加上一个盖玻片，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 μ l（长 1 mm，宽 1 mm，高 0.1 mm）。计算获得的细胞数量。原生质体密度（个/mL）=25 个中方格原生质体数 $\times 10^4 \times$ 稀释倍数。



9. 100 g 离心 1 min, 升速 3, 降速 3, 去上清, 用相应体积的 MMg 溶液重悬原生质体, 调整原生质体密度为 2×10^5 /mL。 (如细胞量较少, 可以将所有细胞用于 1-2 个转化体系)

三、原生质体的转化

1. 在 2 mL 的圆底离心管中加入 10 μ L (10-20 μ g) 纯化后的质粒, 随后加入 100 μ L 原生质体, 轻轻混匀, 再加入 110 μ L 溶液 IV-PEG solution, 轻轻旋转离心管, 或使用剪尖蓝枪头 (1ml 吸头) 轻轻吸打, 直至混匀, 此过程中避免产生气泡, 室温放置 3-30 min。 (常规实验约需 15min, 间歇轻柔混匀)

2. 加入 0.44 mL 溶液 II-W5 solution, 轻柔混匀, 终止转化。常温 100 g 离心 1 min, 升速 3, 降速 3, 在不损失原生质体的情况下, 尽可能去除上清。

四、原生质体的培养和收集:

1. 加入 1 mL 溶液 II-W5 solution 悬浮细胞。将离心管水平放置于光照培养箱中 (20-25 $^{\circ}$ C), 避免强光照, 孵育 6-18 h。

2. 收集细胞时, 缓慢将离心管拿起, 用枪头轻柔的将附着在管壁上的细胞悬起, 离心管室温垂直静置几分钟后离心, 150 g 离心 2 min, 升速 3, 降速 3, 去除大部分溶液 II-W5 solution, 富集细胞, 用于后续实验。

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的轻柔。

2. 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平角转头。

3. 实验过程中尽可能使用剪尖蓝枪头 (1ml 吸头), 因为其尖端的孔径较大; 或把黄色枪头的尖端剪掉, 并保证平滑。