M5 HiPer 植物原生质体制备及转化试剂盒
使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 HiPer 植物原生质体制备及转化试剂盒	40T	MF963-01

【储存条件】

常温运输；-20℃保存，至少一年有效。组分 I，II，III，V 4℃ 3-5 天不会影响使用效果，长期不用，-20 度保存贮存。

【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定的差异)，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，本试剂盒可以用于相当于 6 孔板 40 个孔的样品，12 孔板 80 个孔的样品，或 24 孔板 160 个孔的样品的转化。

【产品组分】

组分货号	名称	规格	储存温度
溶液 I	酶溶解溶液（2×）	100 ml	-20℃
溶液 II	漂洗溶液	200 ml	-20℃
溶液 III	重悬溶液	25 ml	-20℃
组份 IV	转化试剂	5 ml	-20℃
溶液 V	培养溶液	25 ml	-20℃
BME	还原剂	1 ml	RT
BSA-02	50mg/ml BSA 溶液	5 ml	-20℃

【自备材料】

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；70μm 细胞过滤筛；一次性刀片；50ml 离心管；1.5ml 离心管；水浴锅。

【使用方法】

一、原生质体分离：

即用型酶溶液配制：

	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℃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。

注意：55oC 孵育可以有效灭活 DNase 和 Protease，并促进酶溶解

还原剂	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，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. 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℃）酶解 3 小时，间歇混匀。

注意：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。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，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。

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。

3. 过滤：用孔径 70 μm 筛网过滤步骤 2 中的溶液，去除未消化的叶片，收集滤出液于 50 ml 离心管中。

4. 第一次收集：滤出液 100g 常温离心 2 分钟，尽量去除上清。

注意：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。

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)。

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 2×105/ml 或更高）。

注意：制备好的原生质体可以在 4 度或冰浴保存至少 24 h。

二、原生质体转化和培养：

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。

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℃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。

	120 μl（1 个样品）	1.2 ml（10 个样品）	5 ml(约 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	0.6 ml	2.5 ml
灭菌水	定容至 120 μl	定容至 1.2 ml	定容至 5 ml

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。

注意：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。

3. 质粒转化：

3.1 质粒管中加入 100 μl 原生质体溶液（原生质体密度为 2×105/ml，约 2 万个原生质体），轻柔混匀。

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，轻柔混匀，常温 25℃放置 5-15 分钟。

注意：最长可以孵育 15 min，但通常孵育 5min 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。

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。

5. 收集原生质体：常温 100g 离心 1-2 分钟，尽量去除上清。

注意：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。

6. 原生质体漂洗：加入 500 μl 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。

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

7. 原生质体重悬：沉淀中加入 1 ml 溶液 V，轻柔重悬。

8. 原生质体培养：将离心管水平放置，23-25oC 弱光培养。

注意：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。

【备注】
本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。