

白车轴草原生质体制备与转化试剂盒

产品货号：BA3116

产品规格：5T

产品简介：

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，通过专用PEG试剂，介导转化。适用于从白车轴草的叶片和茎秆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。

产品组成：

	产品名称	5T	保存条件
A盒	酶解缓冲液 EC1	110mL	-20°C，避光
	酶解缓冲液 EC2	8mL	-20°C，避光
	酶 E1	1.3g	-20°C，避光
	酶 E2	0.5g	-20°C，避光
B盒	培养液 CM	100mL×4	2-8°C
	重悬液 RS	15mL	2-8°C
	转化液 TP	18mL	2-8°C
	细胞筛	5个	2-8°C

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20mL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。

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；50mL圆底离心管；2mL离心管，切过尖的蓝枪头和黄枪头，10μL白枪头。

2. 酶解液配制

配制顺序	组份	20mL体积
第一步	酶解缓冲液 EC1	19mL
	酶 E1	0.2g
	酶 E2	0.06g
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	酶解缓冲液 EC2	200μL
第四步	加酶解缓冲液EC1定容	

注：

1. 酶解液必须现配现用。
2. 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. 准备生长20-30d的白车轴草幼苗，取叶片和茎秆部分。建议使用无菌苗，效果更佳。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

注：若使用土培苗，最好用无菌ddH₂O冲洗叶片擦干后使用，减少细菌的繁殖。

- 取3-5株幼苗（样品量约0.5-1g，可适当增加），用锋利刀片垂直主叶脉，将叶片切丝，将茎秆切段，宽度均保持在0.5-1.0mm。将切好的细段放入装有20mL酶解液的150mL容积的锥形瓶，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。

- 避光28°C，45rpm摇床上孵育5h（请严格遵守时间）。
- 用1mL培养液CM润洗细胞筛，打破滤网的表面张力，便于后续过滤的流畅性。
- 将酶解后的产物用细胞筛过滤，用镊子或枪头尾部轻轻挤压酶解物帮助充分释放原生质体，此时肉眼可见绿色液体滴落（挤压步骤十分重要）。用5mL的培养液CM冲洗酶解器皿和未消化的叶片2次（用切过尖的蓝枪头冲洗），并再次挤压，将所有的液体收集到一个50mL离心管中。

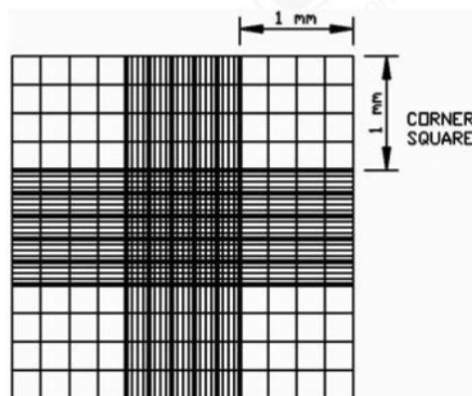
注：操作过程尽可能轻柔，避免剧烈震荡，过滤时可以将50mL离心管倾斜70°可以缓冲溶液下落时产生的碰撞力，防止原生质体破碎。

- 用切尖枪头，取一滴酶解液进行镜检。若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。
- 选用水平转子，室温150g离心5min，升速3，降速3，去除上清（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。
- 向上述沉淀中加入2mL培养液CM温柔重悬位于底部的原生质体（切过尖的蓝枪头），避光冰浴30min。
- 将离心管于室温150g离心5min，升速3，降速3，去除上清。
- 向上述沉淀中加入适量(约2-3mL)的重悬液RS重悬原生质体，调整原生质体密度为 2×10^5 /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 μ L/1个反应）。

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1mm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1mm，宽1mm，高0.1mm）。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。



三、原生质体的转化

- 在2mL圆底离心管中加入5-20 μ g（总体积不超过10 μ L）纯化后的高质量质粒（建议去内毒素），随后加入100 μ L上述重悬后的原生质体。再加入110 μ L的转化液TP，缓慢颠倒混匀，室温避光孵育15min。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），建议购买去内毒素质粒大提试剂盒（增强型）。原生质体与转化液TP较难混匀，请耐心缓慢的吸打，以至充分混匀，保证转化效率。若转化液TP有析出，需65°C水浴完全溶解后（约10min），冷却至室温后使用。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

2. 加入1mL培养液CM，轻柔颠倒混匀，终止转化。室温150g离心5min，升速3，降速3，在不损失原生质体的情况下，尽可能去上清。

四、原生质体的培养和收集

1. 加入1mL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。将离心管水平室温避光放置，孵育16-20h。
2. 收集细胞时，缓慢拿起离心管，用枪头将附着在管壁上的细胞轻轻悬起，室温150g离心5min，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。

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，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原生质体转。

有效期: 18个月。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址:郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com