

植物原生质体分离试剂盒

产品编号	产品名称	包装
C0362S	植物原生质体分离试剂盒	5ml×20次

产品简介:

- 碧云天生产的植物原生质体分离试剂盒(Plant Protoplasts Isolation Kit), 是一种能够简单、快捷地通过酶学方法消化植物尤其是拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)细胞壁中的纤维素并释放出大量且具有生物活性的原生质体的试剂盒。使用本试剂盒分离出的原生质体可用于质粒DNA转染以及原生质体融合等实验研究。
- 植物原生质体是指去除掉细胞壁后由细胞膜包被的具有生命活力的植物细胞体。植物细胞壁的主要成分为纤维素(cellulose), 半纤维素(hemicellulose)和果胶(pectin)等。植物细胞壁组分被适当的酶消化降解后, 就能释放出无细胞壁包被的植物原生质体。原生质体是开展一系列植物细胞研究的重要材料, 可以用于短时间基因表达(transient gene expression)、病毒感染(viral transfection)、体细胞杂交(somatic hybridization)、电生理研究(electrophysiological study)和形态学研究(morphological study)等, 从而在植物亚细胞定位(subcellular localization)、蛋白活性分析以及蛋白与蛋白相互作用(protein-protein interaction)等研究方面发挥重要作用。
- 使用本试剂盒处理拟南芥叶片所获得的原生质体效果图(图1):

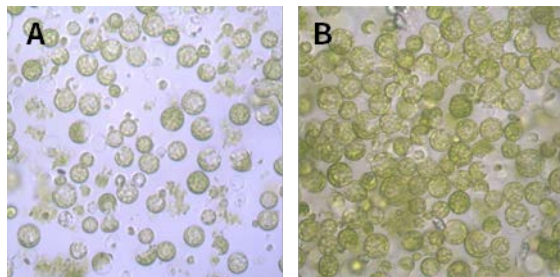


图1. 碧云天生产的植物原生质体分离试剂盒(Plant Protoplasts Isolation Kit)分离制备的拟南芥原生质体效果图。酶解体系配制(5ml): 称取0.095g Enzyme Mix, 加入2.5ml 2X Digest Buffer, 55°C水浴10min使酶充分溶解, 冷却至室温后, 分别加入100 μl Digest Solution I, 10 μl Digest Solution II和50 μl Digest Solution III, 加无菌水定容至5ml, 轻轻混匀并溶解后, 用0.45 μm针头滤器(FF365)过滤。生长状态良好的拟南芥叶片20片, 去除叶片的尖端与基部, 用刀片(FS205)切成0.5-1mm小条, 浸入细胞壁消化液中, 真空干燥器抽真空30min, 避光条件下消化3h后, 轻轻摇动并吸取少量消化液在光学显微镜下观察游离的原生质体(图A)。消化比较充分后, 将所得原生质体溶液用1X Dilution Buffer进行等体积稀释, 再用70 μm孔径的细胞过滤器(FSTR070)过滤所获得的原生质体溶液, 以去除未消化完全的叶片, 室温下100g离心1min, 去除上清, 将其重悬于500 μl Resuspension Buffer中, 吸取100 μl重悬的原生质体, 光学显微镜下观察原生质体的数量与形态(图B)。实际的检测效果会因检测条件的不同而存在差异, 本图仅供参考。

- 按照每次使用5ml细胞壁酶消化体系计算, 本试剂盒可用于20次细胞壁酶消化反应。本试剂盒每个5ml反应体系可处理0.1g左右的拟南芥叶片(约10~15叶片), 操作较好的情况下每5ml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25-100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)。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
C0362S-1	2X Digest Buffer	50ml
C0362S-2	Enzyme Mix	2g
C0362S-3	Digest Solution I	2ml
C0362S-4	Digest Solution II	200 μl
C0362S-5	Digest Solution III	1ml
C0362S-6	5X Dilution Buffer	50ml
C0362S-7	Resuspension Buffer	50ml
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存, 至少一年有效。C0362S-2 Enzyme Mix可长期4°C保存, 其余组分4°C存放数天不会影响使用效果。数天内连续使用

的情况，可以全部保存在4°C。

注意事项：

- 细胞壁消化液必须现配现用，不能配制后冻存用于后续用途。
- 请按照试剂盒要求的保存条件存放相关试剂，使用时请将各溶液充分融解并混匀，尽量避免过多的反复冻融。
- 2X Digest Buffer (C0362S-1)以及Resuspension Buffer (C0362S-7)容易被微生物污染，使用时须严格按照无菌操作规范进行或者适当分装后使用。
- 所制备的原生质体如果后续需要用于转染、培养等相对较长时间的用途，所有操作都必须按照无菌操作规范进行。
- 需使用者自备的实验仪器与耗材：水浴锅(E0530)，0.45μm针头滤器(FF365)，手术刀片(FS205)，平头镊子(FS035)，70μm细胞过滤器(FSTR070)以及离心管等其它耗材。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 取如下条件生长的拟南芥叶片，或其它适当的植物叶片等组织。

将拟南芥种植于温室营养土中，短日照(10-13h light at 23°C/11-14h dark at 20°C)，弱光(50-75μEm⁻²s⁻¹)条件下培养，保持相对湿度为40-65%，大约3-4周后可进行原生质体制备。

2. 原生质体分离：

- a. 冰上解冻并混匀所需的各个组分，参考如下体系配制细胞壁消化液，并使用0.45μm针头滤器(FF365)过滤除去不溶杂质，溶解好的细胞壁消化液应为澄清棕黄色溶液。55°C孵育可以有效灭活DNase和Protease，并促进酶溶解。

Reagent	Volume
2X Digest Buffer	2.5ml
Enzyme Mix	0.095g
Incubate at 55°C for 10min. Cool to room temperature, and add the following reagents.	
Digest Solution I	100μl
Digest Solution II	10μl
Digest Solution III	50μl
Water (Sterile)	2.34ml
Total	5ml

- b. 选取长势较好的3-4周龄的拟南芥幼苗，取0.1g左右的拟南芥叶片(约10~15叶片)，用刀片去除叶片的尖端与基部，或选择适当的其它植物叶片等组织(宜尽量选择柔嫩部位)，并将其切成0.5-1mm左右的小条，用平头镊子将切好的小条放入准备好的细胞壁消化液中并使其完全浸入。
- c. 使用玻璃真空干燥器室温避光条件下抽真空30min，以使细胞壁消化液更好地进入细胞间隙。在室温条件下，无需振摇，酶消化3h。细胞壁消化液在缓慢旋转后变成绿色，表示已有原生质体释放。注意：酶消化的时间不同植物不同部位会有较大的差别，3h为对于拟南芥叶片的推荐时间，实际操作时可以根据原生质体的释放情况，酌情调整消化时间。真空泵使用实验室内常用的用于吸除液体的真空泵即可，例如碧云天的E0110、E0111、E0112、E0113、E0114或E0115真空泵。
- d. 显微镜下观察和检查原生质体的释放情况，拟南芥原生质体大小约为30-50μm。无须等原生质体完全释放出来后再进行后续操作的。如果消化时间过长，也会对原生质体产生一定的负面影响。
- e. 取适量5X Dilution Buffer，用水稀释至1X，用等体积的1X Dilution Buffer稀释原生质体，70μm细胞过滤器(FSTR070)或者75μm孔径的尼龙筛网(约200目)过滤去除未消化的叶片组织。
- f. 收集滤液于50ml离心管，室温100g离心1-2min，尽量去除上清，用5ml 1X Dilution Buffer重新悬浮原生质体，室温静置30min。
- g. 原生质体在重力作用下会在离心管底部沉降，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，也可以考虑室温100g离心1-2min)，加入约1.5-2.5ml或更小体积的Resuspension Buffer，将原生质体以 2×10^5 /ml的密度或更高密度悬浮于重悬液中，即为原生质体悬液。制备好的原生质体可以在4°C或冰浴保存至少24h。

常见问题：

1. 原生质体产量低及形态异常。

- a. 拟南芥的生长状态对原生质体的分离效率有非常大的影响。拟南芥种子的生长及保存条件、土壤养分、温度、湿度、光照周期、光照强度等诸多因素均可能会影响植物的生长状态，且不同的拟南芥株系生长条件略有差异，故尽量保证合适的拟南芥生长条件并选用形态及生长良好的叶片进行原生质体分离。
- b. 检查细胞壁消化液的配制是否正确。
- c. 确保加入Enzyme Mix后在55°C孵育了10min。
- d. 根据不同植物以及突变体株系适当调整酶消化的时间。
- e. 离心沉淀原生质体时离心力过高或时间过长。
- f. 叶片的碎条需要和细胞壁酶消化液充分接触。如果叶片的碎条没有及时放入到细胞壁酶消化液中而出现了干燥的情况，后续就

较难被细胞壁酶消化液充分浸润，从而会严重影响原生质体的得率。此外，抽真空，去除叶片碎条表面的微小气泡，也是细胞壁酶消化液充分对细胞壁进行消化的必要条件。

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C0362S	植物原生质体分离试剂盒	5mlx20 次
C0563S	植物原生质体转染试剂盒	100 次
C0563M	植物原生质体转染试剂盒	500 次
D2489-1μg	pRD29B-luc (植物报告基因质粒)	1μg
D2489-100μg	pRD29B-luc (植物报告基因质粒)	100μg
D2491-1μg	pUBI10-GUS (植物报告基因质粒)	1μg
D2491-100μg	pUBI10-GUS (植物报告基因质粒)	100μg
D2627-1μg	p35SPPDK-EGFP-Flag (植物用绿色荧光蛋白)	1μg
D2627-100μg	p35SPPDK-EGFP-Flag (植物用绿色荧光蛋白)	100μg
P0043-100ml	植物 Western 及 IP 细胞裂解液	100ml
P0045-100ml	植物 RIPA 裂解液(强)	100ml

Version 2020.07.17