

拟南芥原生质体制备与转化试剂盒 使用说明书

(2025 第 1 版)

产品编号：FK12446-10T（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	储存温度
A 盒	FK12446-1	酶解缓冲液 EC (Buffer EC)	80 mL	-20 ℃
	FK12446-2	酶 E1 (Enzyme 1)	1.5 g	
	FK12446-3	酶 E2 (Enzyme 2)	0.35 g	
	FK12446-4	BSA (10%)	2.5 mL	
	FK12446-5	AMP (100 mg/mL)	1 mL	
B 盒	FK12446-6	培养液 CM (Buffer CM)	120 mL×6	RT
	FK12446-7	重悬液 RS (Buffer RS)	30 mL	
	FK12446-8	转化液 TP (Buffer TP)	36 mL	
	FK12446-9	还原剂 (β-me)	100 μL	
	FK12446-10	细胞筛	10 个	

产品简介：

此试剂盒主要通过纤维素酶和离析酶消化植物细胞壁，再经过滤洗涤去除杂质获得原生质体，通过聚乙二醇（PEG）法进行原生质体融合。适用于从 30 d 的拟南芥幼苗中分离原生质体。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。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 10 次原生质体制备以及 240 个转化反应。

使用说明：

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 离心管；2 mL 离心管，切过尖的灭菌蓝枪头和黄枪头、10 μL 白枪头（进口的更佳）。

2. 酶解液配制

配制顺序	组分	10 mL 体积
第一步	酶解缓冲液 EC	8 mL
	酶 E1 (Enzyme 1)	0.15 g
	酶 E2 (Enzyme 2)	0.03 g
第二步	混匀后 55 °C 水浴 10 min，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 µL
	还原剂	3.57 µL
	Amp (100 mg/mL)	5 µL
第四步	加去离子水定容	
第五步	过滤除菌（可选步骤）	

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。
3. 将**培养液 CM** 放在冰上预冷，便于后续使用。

二、原生质体的分离制备

1. 准备 30 d 的拟南芥幼苗，优选第 2、3 和 4 对叶片（黄化的原生质体更稳定）。建议使用无菌播种得到的拟南芥幼苗，效果更佳。

注：若使用土培苗，最好用无菌 ddH₂O 冲洗擦干后使用，减少细菌的繁殖。

2. 取 10-20 个拟南芥叶片（样品量约 1 g，可适当增加），用锋利刀片平行主叶脉，切成 0.5-1.0 mm 的细丝。
3. 将切好的细丝放入装有 10 mL **酶解液** 的 50 mL 容积的小烧杯中，锡箔纸包裹，烧杯口留洞。

注：避光步骤可防止原生质体重新生长出细胞壁，植物细胞壁不利于后续转化。

4. 避光 28 °C，45 rpm 摇床上孵育 3-4 h。收集原生质体前，80 rpm 摇动 5 min，让原生质体完全释放出来。
5. 用 1 mL **培养液 CM** 润洗细胞筛后，弃废液。

6. 将酶解后的产物用细胞筛过滤，用镊子或无菌枪头轻轻挤压酶解物帮助充分释放原生质体，此时肉眼可见浓绿色液体滴落（挤压步骤十分重要）。用 5 mL 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），将所有的液体收集到一个 50 mL 离心

管中。

可选：也可以在第一次过滤后，小心将植物组织转移到锥形瓶中，加入 10 mL 的培养液 **CM**，在 28 °C 摇床 80 rpm 摇动 5 min，第二次过滤后，再用 5 mL 培养液 **CM** 冲洗酶解器皿和未消化的叶片 2 次。二次重悬过滤可以一定程度提高原生质体的产率，增加转化数。

注：1. 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°，可以缓冲溶液下落时产生的碰撞力，防止原生质体破碎。2. 黄化苗酶解后的原生质体不呈绿色，过滤完成后，可以取一滴酶解液镜检，如果细胞圆而发亮，则健康，可继续进行实验；如果细胞扁且发黑，则弃去。

7. 选用水平转子，室温 100 g 离心 3 min，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。且过快的升降速会使原生质体破碎。建议升速和降速分别都使用 3。

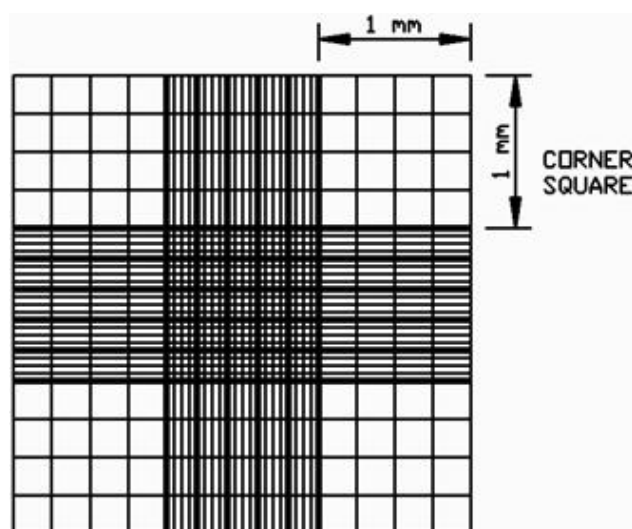
8. 加入 10 mL 培养液 **CM** 温柔重悬位于底部的原生质体(切过尖的蓝枪头), 100 g 离心 3 min，升速 3，降速 3，去上清。

9. 加入 1 mL 培养液 **CM**，重悬原生质体，冰上避光静置 30 min。

10. 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 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。原生质体浓度（个/mL）= 25 个中方格原生质体数 $\times 10^4 \times$ 稀释倍数。



11. 100 g 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 μL /1 个反应)

三、原生质体的转化

1. 在 2 mL 的灭菌圆底离心管中加入 3-20 μg (总体积不超过 10 μL , 根据实验需要用无菌 ddH₂O 补齐) 纯化后的高质量质粒 (建议去内毒素), 随后加入 100 μL 调整好浓度的原生质体, 轻弹充分混匀。

2. 加入 110 μL 的**转化液 TP**, 轻弹混匀或切过尖的蓝枪头轻轻吸打混匀, 过程中应避免产生气泡, 室温孵育 3-30 min (常规实验不超过 15 min)。

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 PE034 去内毒素质粒大提试剂盒 (吸附柱法)。**转化液 TP** 较难溶解, 需 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴完全溶解后 (约 10 min), 冷却至室温后使用。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。

3. 加入 500 μL **培养液 CM**, 轻柔颠倒混匀, 终止转化。室温 100 g 离心 2 min, 升速降速 3, 在不损失原生质体的情况下, 尽可能去上清。

4. 加入 500 μL **培养液 CM** 重悬原生质体, 室温 100 g 离心 2 min, 升速 3, 降速 3, 去上清。

四、原生质体的培养和收集

1. 加入 500 μL **培养液 CM** 培养悬浮细胞。将离心管水平室温避光放置, 孵育 12-16 h。

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, 离心管室温垂直静置 3 min 后再离心, 室温 100 g 离心 2 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。

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. 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子。

3. 实验过程中尽可能使用切过尖的 1 mL 蓝枪头, 保证平滑。因为其尖端的孔径较大, 会避免原生质体破裂。

4. 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。

5. 转化时建议添加空载荧光对照, 以验证操作步骤无问题。

6. 土培的成株期植株的组织分离效果会偏差, 属于正常现象。