

植物原生质体分离与转化试剂盒

Plant Protoplast Isolation and Transformation Kit

产品编号	产品名称	包装规格
NBS0235-40T	植物原生质体分离与转化试剂盒	40T

产品简介:

原生质体 (Protoplast) 是指植物细胞去掉细胞壁后的裸露部分, 体外培养条件下, 具有以下功能: 1) 具全能型, 可再生细胞壁, 进行连续的细胞分裂且能再生成完整植株的能力; 2) 具摄取外源大分子、细胞器, 以及细菌、病毒的能力, 从而原生质体是进行遗传操作, 基因转移的良好材料; 3) 通过同种和异种植物的原生质体融合, 可产生异核体, 实现体细胞杂交, 从而培育出具有抗病原或更高产量的新品种。

原生质体 (Protoplast) 的制备最主流的技术是酶解法, 因其具有消化温柔, 操作简单, 且良好维持原生质体完整性的特点。工作原理是根据植物细胞壁的结构特征选择合适的酶进行处理, 植物细胞壁主要由多糖 (纤维素、半纤维素、果胶等) 以及少量的蛋白和脂质构成。因此, 通过使用纤维素酶、离析酶、半纤维素酶、果胶酶等复合酶来降解细胞壁, 即可得到原生质体。

原生质体 (Protoplast) 的转化方法很多, 主要有 PEG 介导转化法、电击穿孔转化法、脂质体介导转化法、农杆菌共培养转化法等。

本试剂盒利用的是 PEG 介导的原生质体转化法, 操作简单和便捷。试剂盒含有植物原生质体制备 (不包含消化酶) 和植物转化需要的所有试剂。原生质体制备, 按照单次 5ml 酶液体系来算, 可做 40 次酶消化反应; 原生质体转化, 按照每次转化 100 μ l 原生质体溶液, 可做至少 40 次转化。

保存条件:

-20 $^{\circ}$ C 保存, 1 年有效。

产品组成:

组分	名称	规格	保存
NBS0235-A	Solution A-Enzyme solution buffer (2 $\times$)溶液 A	100ml	-20 $^{\circ}$ C 保存

NBS0235-B	Solution B-W5 solution 溶液 B	200ml	-20℃保存
NBS0235-C	Solution C-MMG solution 溶液 C	25ml	-20℃保存
NBS0235-D	Solution D-Transformation solution 溶液 D	2.5ml	-20℃保存
NBS0235-E	Solution E-WI solution 溶液 E	25ml	-20℃保存
NBS0235-F	Solution F-Reduced reagent 溶液 F	1ml	RT 保存
NBS0235-G	Solution G-BSA solution (50mg/ml)	5ml	-20℃保存

产品使用：

一、需要准备材料

- 1.1 离析酶 R-10 (货号：NBS9032-1g)
- 1.2 纤维素酶 R-10 (货号：NBS9510-1g)
- 1.3 70μm 细胞筛网
- 1.4 平头镊子
- 1.5 一次性刀片
- 1.6 1.5ml 离心管
- 1.7 50ml 离心管
- 1.8 恒温加热水浴锅

二、原生质体分离

2.1 按照以下表格体系，配制即用型酶溶液：【注意：此溶液现配现用】

组分	10ml 配制量	50ml 配制量
溶液 A (2×酶溶解液)	5ml	50ml
离析酶 R-10	40mg	200mg
纤维素酶 R-10	150mg	750mg
溶液 F (还原剂)	5 μl	25μl
溶液 G (50mg/ml BSA)	0.2ml	1ml
无菌水	定容到 10ml	定容到 50ml

2.2 取生长状态良好的叶片切成 0.5-1mm 的小条，按照 20 个叶片加 10ml 即用型酶溶液的比例迅速将切好的叶片小条浸泡于即用型酶溶液内，室温避光酶解 3h。

【注意】：酶解时间与叶片类型、叶片生长状态有关，请根据实际实验进行调整。酶溶液变为

绿色表明原生质体已经分离，显微镜镜检确定是否分离。

2.3 酶解后加入 10ml 溶液 B，轻柔混匀。

2.4 用 70 μ m 细胞筛网过滤步骤 2.3 获得的溶液，去除未消化的叶片和杂质，收集滤液到 50ml 离心管内。

2.5 滤液于 100 $\times$ g，室温离心 2min，吸掉上清。

2.6 加 1ml 溶液 B 重悬原生质体，冰浴 30min，使得原生质体自然沉淀到底部。

2.7 小心吸掉上清，不要触动原生质体沉淀。将沉淀重悬于 1ml 溶液 C，即得到原生质体溶液。

三、原生质体转化

3.1 取 10 μ l 质粒 DNA（浓度为 1-2 μ g/ μ l）于 1.5ml 离心管。

3.2 加入 100 μ l 原生质体溶液，轻柔混匀。

3.3 加入等体积（110 μ l）溶液 D，轻柔完全混匀，室温孵育 15min，间歇轻柔混匀。

3.4 加入 2 倍体积（440 μ l）溶液 B，轻柔完全混匀，终止转化过程。

3.5 于 100 $\times$ g，室温离心 2min，吸掉上清。

3.6 将沉淀重悬于 1ml 溶液 E 中。

四、原生质体培养和收集

4.1 原生质体溶液室温孵育 2-16h。

【注意】：根据特定实验确定孵育时间。RNA 分析一般孵育 2-6h；酶活性分析和蛋白标记一般孵育 2-16h。

4.2 于 100 $\times$ g，室温离心 2min 收集原生质体，去掉大部分上清。

4.3 原生质体沉淀重悬于剩余溶液中，-80 $^{\circ}$ C 保存。

注意事项：

1. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

本产品仅用于生命科学研究，不得用于医学诊断及其它用途！

相关产品：

产品编号	产品名称	包装规格
<u>NR0355-100mg</u>	<u>Driselase, from Basidiomycetes Sp. 崩溃酶</u>	100mg
<u>NBS4942-100mg</u>	<u>分散酶（中性蛋白酶）Dispase II</u>	100mg
<u>NBS9032-1g</u>	<u>Macerozyme R-10 离析酶 R-10</u>	1g
<u>NBS9054-1g</u>	<u>Cellulase RS 纤维素酶 RS</u>	1g
<u>NBS9510-1g</u>	<u>Cellulase R-10 纤维素酶 R-10</u>	1g
<u>NBS8050-1g</u>	<u>Snailase 蜗牛酶</u>	1g
<u>NBS8057-100mg</u>	<u>Pectolyase Y-23 果胶酶 Y-23</u>	100mg
<u>NBS8058-50KU</u>	<u>半纤维素酶，来源于黑曲霉</u>	50KU
<u>NBS0235-40T</u>	<u>植物原生质体分离与转化试剂盒</u>	40T
<u>NBS0236-10T</u>	<u>拟南芥原生质体制备与转化试剂盒</u>	10T
<u>NBS0237-5T</u>	<u>水稻原生质体制备与转化试剂盒</u>	5T
<u>NBS0238-5T</u>	<u>小麦原生质体制备与转化试剂盒</u>	5T
<u>NBS0239-10T</u>	<u>生菜原生质体制备与转化试剂盒</u>	10T