

Lettuce Protoplast Isolation and Transformation Kit

生菜原生质体制备与转化试剂盒

产品编号	产品名称	包装规格
NBS0239-10T	生菜原生质体制备与转化试剂盒	10T

产品简介:

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。本试剂盒通过酶解法消化水稻幼苗的细胞壁，分离原生质体。获得的原生质体可以用于亚细胞定位、转录因子的调控、蛋白活性分析以及蛋白与蛋白相互作用等方面的研究。

本试剂盒包含原生质体制备和转化需要的全部试剂，每次制备的原生质可支持 20 个以上的转化反应。

产品特点:

1. 高活高得率：酶解体系精准优化，原生质体形态完整、活性高，得率稳定有保障，为高效转化筑牢基础。
2. 转化效率优：专用转化液适配水稻特性，阳性对照转化效 $\geq 50\%$ ，荧光信号清晰，实验结果稳定可重复。
3. 一站式即用：涵盖从原生质体制备到 PEG 介导转化全流程预配试剂，无需复杂自制，新手也能快速上手。

保存条件:

按照说明书温度保存，1 年有效。

产品组成:

组分	名称	规格	保存
NBS0239-A	酶解缓冲液 EB	3x30ml	-20℃保存
NBS0239-B	酶 E1	0.5g	-20℃保存
NBS0239-C	酶 E2	0.25g	-20℃保存
NBS0239-D	BSA (10%)	1.5ml	-20℃保存

NBS0239-E	AMP (100mg/ml)	60μl	-20℃保存
NBS0239-F	培养液 CS	5x125ml	RT 保存
NBS0239-G	重悬液 RS	30ml	RT 保存
NBS0239-H	转化液 TS	20ml	RT 保存
NBS0239-I	细胞筛	10 个	RT 保存
NBS0239-J	刀片	10 个	RT 保存

产品使用：

1. 自备实验仪器与耗材：

低温水平离心机；水浴锅；0.45μm 针头滤器；50ml 圆底离心管；2ml 圆底离心管；去尖的灭菌蓝枪头和黄枪头；

2. 酶解液配制（当天制备）

配制顺序	组分	10ml 体积
第一步	酶解缓冲液 EB	8ml
	酶 E1	0.04g
	酶 E2	0.02g
第二步	搅拌溶解，55℃水浴 10min，期间颠倒混匀 2-3 次，冷却后再加入以下成分	
第三步	BSA (10%)	100μl
	AMP (100mg/ml)	5μl
第四步	去离子水定容	
第五步	过滤除菌（选做）	

注：

1. 酶解液必须现配现用；
2. 培养液 CS 和重悬液 RS 使用前需冰上预冷；
3. 转化液 TS 若出现结晶，65℃水浴完全溶解后，冷却至室温待用。

3. 原生质体的制备

1. 将培养 7-14 天的生菜取出 2-5 片叶（约 0.5-1g，可适当增加），用锋利的刀片垂直主叶脉，快速切割成 0.5mm 左右的小段，越细越好，不要撕扯。

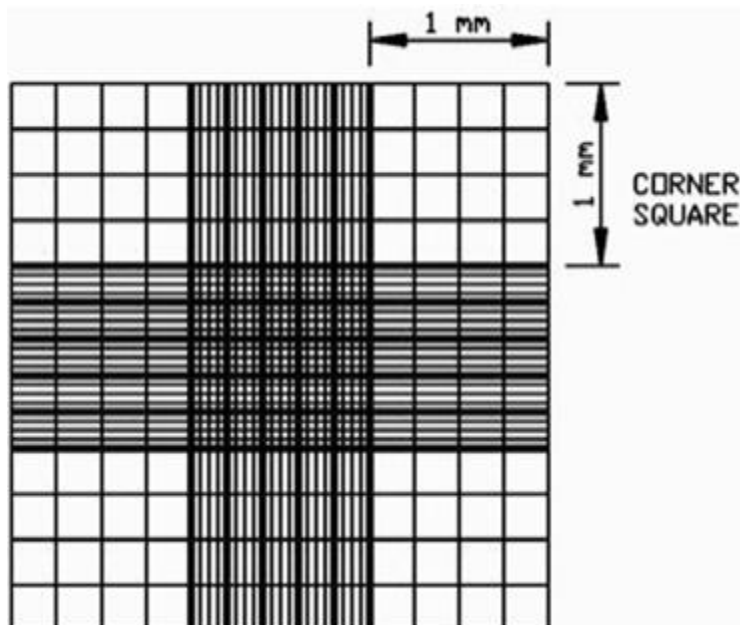
注：建议使用无菌苗，效果更佳；若使用土培苗，需用无菌水充分冲洗擦干后使用。

2. 将切好的小段放入装有 10ml 酶解液的 50ml 三角瓶中 (或细胞培养皿中), 用锡纸包裹。
3. 避光 28°C, 50rpm 摇床孵育 4-5h。最后 2min 提高转速到 80rpm, 释放原生质体。此时可以取一滴进行镜检, 如果细胞圆而发亮, 则健康, 继续往下做; 如果细胞扁且发黑, 则弃去。
4. 酶解结束前准备: 细胞筛卡在圆底 50ml 离心管口, 用 1ml 培养液 CS 润洗细胞筛后, 弃废液待用; 4°C 预冷离心机, 加速、减速加速度设置为 3, 转速 150g。
5. 酶解结束后, 向三角瓶中缓缓加入与酶解液等体积的培养液 CS, 适当用力摇 10s, 将酶解液混匀释放原生质体, 酶解产物用细胞筛过滤; 用适量的培养液 CS 冲洗三角瓶中剩余的酶解产物到细胞筛过滤; 最后用镊子或枪头轻轻挤压酶解物以充分释放原生质体, 再用适量的培养液 CS 冲洗细胞筛几次, 最后的滤液体积不要超过离心管容量。
6. 选用水平转子。配平后, 150g 离心 5min, 加速、减速加速度为 3。
7. 小心拿出离心管, 用 1ml 去尖枪头小心吸走上清, 也可以使用电动移液器或台泵 (把速度调的稍低一点, 小心吸取, 切勿碰到原生质体)。管底沉淀即为原生质体。
8. 缓缓加入 4ml 培养液 CS, 将离心管沿竖直方向, 左右倾斜至 45°角, 缓慢晃动使原生质体重悬。冰浴 30min, 同时取样按第 9 步镜检计数。

9. 镜检计数

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。



10. 30min 后, 原生质体将自然沉降于管底。若沉降不彻底, 可采用 150g 离心 2min, 升

降加速度均设为 3。小心吸去上清，缓慢加入重悬液 RS，重悬原生质体，确保原生质体密度为 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 以上（加入重悬液的体积 = $100\mu\text{l} \times$ 转化数，并多预留 $200\mu\text{l}$ ）。

4. 原生质体的转化

1. 在冰浴期间准备：在 2ml 灭菌圆底离心管中加入体积 $10\mu\text{l}$ 、总量 2- $10\mu\text{g}$ 的质粒（建议使用去内毒素质粒；体积不足用无菌 ddH₂O 补足；大的质粒，则用 $10\mu\text{g}$ ，比如 GFP 融合质粒）。

2. 向 2ml 离心管中（已加入 $10\mu\text{l}$ 质粒）加入 $100\mu\text{l}$ 重悬后的原生质体，轻轻拍打混匀。

3. 加入 $110\mu\text{l}$ 转化液 TS，轻轻拍打混匀并计时，室温避光孵育 15min。

注：原生质体和转化液较难混匀，请耐心拍打，直至充分混匀。

4. 孵育结束后，缓缓加入 $440\mu\text{l}$ 培养液 CS，立即轻柔上下颠倒混匀以终止转化反应。

5. 将离心机转头换成 2ml 的小转头， $150g$ 离心 3min，加速、减速加速度为 3。在不损失原生质体的情况下，用 $200\mu\text{l}$ 枪头尽可能吸走上清。

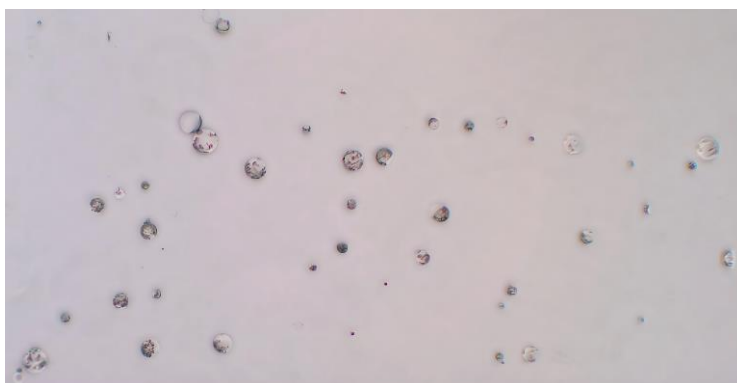
6. 加入 1ml 培养液 CS，轻轻拍打重悬原生质体。 $150g$ 离心 3min，加速、减速加速度为 3。小心吸走上清。

7. 加入 1ml 培养液 CS，轻轻混匀后平置离心管， 28°C （或室温）暗培养 12-16hrs（不要短于 8 hrs 或者超过 24 hrs，最好 8-16 hrs 之内）。

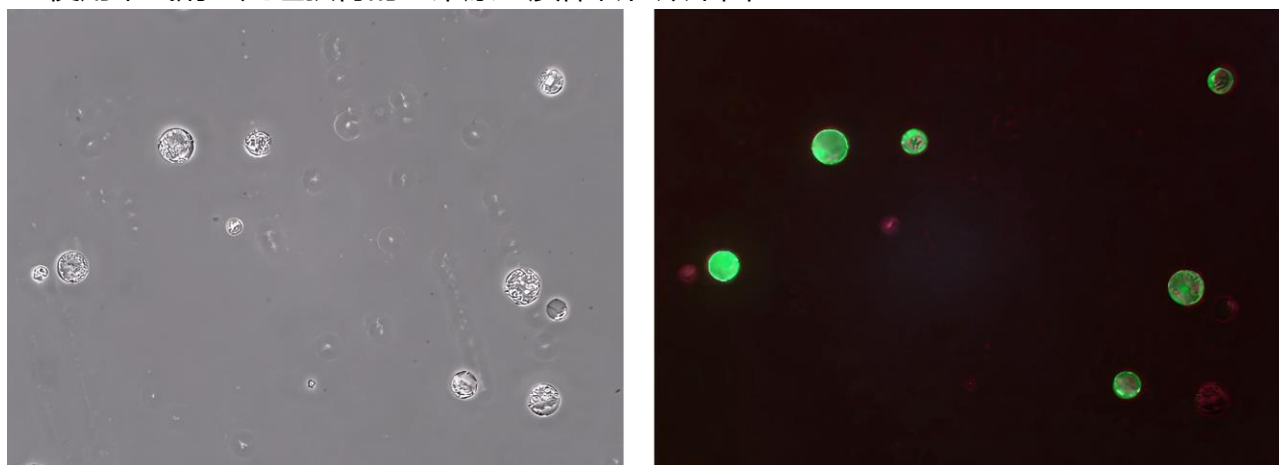
8. 培养结束后，缓慢拿起离心管，轻轻拍打重悬原生质体，离心管室温垂直，静置 3min 后再离心， $150g$ 离心 3min，加速、减速加速度为 3，去除大部分培养液，仅留底部 $100\mu\text{l}$ ，用于后续实验。用去尖黄枪头吸取 $10\mu\text{l}$ 滴在载玻片上观察（每次吸取观察前，轻轻拍打混匀，因为重力作用，大部分原生质体有可能会沉淀在底部）。

注意事项：

1. 分离细胞壁后的原生质体非常脆弱，整个实验操作过程需要尽可能温柔的操作。
2. 离心时为了避免与管壁摩擦导致原生质体破裂，建议使用水平转子。若无水平转子，适当调整离心力和离心时间等参数。
3. 实验中使用去尖的枪头，避免原生质体破裂。
4. 转化时推荐添加阳性对照。
5. 培养液 CS 和重悬液 RS 容易被微生物污染，建议适当分装后使用；或者开盖后置于 4°C 放置。如果溶液出现絮状物等污染，少量污染可以用 $0.22\mu\text{m}$ 过滤器过滤后使用，大量污染丢弃。
6. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

实验数据：**1. 使用本试剂盒处理生菜叶片获得的原生质体效果图**

图：取生长 14 day 的生菜叶片(1 g)，经过酶解、过滤后，取少量滤液在光学显微镜下观察游离的原生质体见上图。

2. 使用本试剂盒处理获得的生菜原生质体转化效果图

图：将 7 μ g 去内毒素的 pB121-eGFP，转入生菜原生质体，图左为明场，图右为荧光。

本产品仅用于生命科学研究，不得用于医学诊断及其他用途！

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