



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

http:// www.real-tims.com.cn

E-mail: real-times@163.com

植物原生质体制备试剂盒

Ver. 710370

货号	名称	包装
RTU4082	植物原生质体制备试剂盒	5 ml×20 次

● 产品组成:

序号	组分货号	名称	规格	贮存	运输
1	RTU4082-01	溶液 I-酶溶解溶液 (2×)	50 ml	-20℃	RT
2	RTU4082-02	溶液 II-漂洗溶液 (5×)	50 ml	-20℃	RT
3	RTU4082-03	溶液 III-重悬溶液	25 ml	-20℃	RT
4	BME	还原剂	1 ml	RT	RT
5	BSA-02	50mg/ml BSA 溶液	5 ml	-20℃	RT
6	CYL0014	Enzyme Premix 酶混合物	2 g	-20℃	RT
7	RT-1070	70 μm 细胞过滤器	5 个/包	RT	RT
		说明书	一份		

● 产品简介:

植物原生质体是指脱去全部细胞壁由质膜包被的具有生命活力的裸露细胞。它具有细胞生命特征和全能型，是细胞无性系变异和突变体筛选的重要来源，同时也是植物遗传工程的理想受体和遗传改良的理想材料。酶解法分离原生质体是一个常用的技术，其原理是植物细胞壁主要由纤维素、半纤维素和果胶质组成，因而使用纤维素酶、半纤维素酶、离析酶和果胶酶能降解细胞壁成分，去除细胞壁，即可得到原生质体。试剂盒配套的酶混合物是纤维素酶 R-10 和离析酶 R-10 的混合物，优化的酶配比能很好地消化植物细胞壁，提取到良好的植物原生质体。

按照每次使用 5 ml 酶消化体系计算，本试剂盒可用于 20 次酶消化反应。本试剂盒每个 5 ml 反应体系可处理 0.1 g 左右的拟南芥叶片(约 10~15 叶片)，操作较好的情况下每 5 ml 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 25-70 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)。

本试剂盒不含有原生质体转化试剂，需要转化请参见植物原生质体转化试剂盒 (RTU4092)。

● 贮存、效期及运输:

按照标签温度保存，至少一年有效。-20℃贮存组分 4℃存放 3-4 天不会影响使用效果。3-4 天经常使用的情况，可以全部保存在 4℃。

试剂盒常温运输。

● 使用说明:

需要准备的材料 (试剂盒不提供):

平头镊子; 一次性刀片; 50 ml 离心管; 水浴锅

一、原生质体分离:

即用型酶溶液配制

	5 ml 配制量
溶液 I-酶溶解溶液 (2×)	2.5 ml
Enzyme Premix 酶混合物	0.095 克
55℃处理 10 分钟, 间歇混匀, 冷却到常温后加入	

注: 本制品仅供科研用。请勿用于人体及动物的医疗、临床诊断或作为食品、化妆品、家庭用品的添加剂等用途。
 中科瑞泰(北京)生物科技有限公司 电话: 400-699-0631 E-mail: real-times@vip.163.com http://www.real-times.com.cn

以下试剂	
还原剂	2.5 μ l
50mg/ml BSA	0.1 ml
灭菌水	定容至 5 ml

注：溶液 I 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。

55°C 处理能灭活核酸酶和蛋白酶并促进酶的溶解；

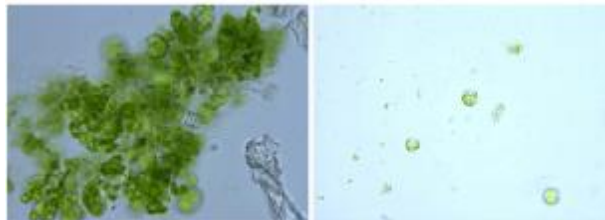
即用型酶溶液现用现配，不建议配制后冻存后再使用；

溶解好的正常酶溶液应为澄清棕黄色溶液，如使用纯度不好的酶，溶液为不溶解的乳白色悬浊液，不能使用。

1. 酶解：

取生长状态良好的叶片切成 0.5-1 mm 的小条，按照 0.1 克叶片（拟南芥约 15-20 个叶片）加 5 ml 即用型酶溶液的比例迅速将切割好的叶片小条浸泡于酶溶液中，避光，无需震荡，常温（20-25°C）酶解 3 小时，间歇混匀。

注：酶解时间与叶片种类，叶片生长状态有关，请根据实验需要适当调整酶解时间。3 小时为拟南芥叶片推荐的酶解时间。如条件允许，可以使用微型真空泵常温避光条件下抽真空 30 min，以使酶溶液更好地进入细胞间隙。酶溶液变为绿色表明有原生质体已经有分离，溶液为浓绿色表明原生质体已经大量分离。拟南芥原生质体大小约为 30-50 μ m，显微镜镜检后确定是否分离。叶片原生质体细胞显微镜下为绿色圆球状，叶绿体分散在整个细胞内，说明状态较好；如呈现不规则形状，说明原生质体破碎或即将破碎。



荷花叶片原生质体（南京农业大学惠赠图片）

2. 漂洗：

取适量溶液 II-漂洗溶液（5 \times ），用超纯水稀释为 1 \times 漂洗溶液。

	1 \times 漂洗溶液
组份	50 ml 配制量
溶液 II-漂洗溶液（5 \times ）	10 ml
灭菌水	40 ml

酶解后加入等体积的 1 \times 漂洗溶液，如使用 5 ml 酶解体系，加入 5 ml 1 \times 漂洗溶液，轻柔混匀。

3. 过滤：

用孔径 70 μ m 筛网过滤步骤 2 中的溶液，去除未消化的叶片，用 5-10 ml 1 \times 漂洗溶液冲洗酶解器皿和未消化的叶片 1-2 次，将所有的液体收到 50 ml 离心管中。

4. 第一次收集：

滤出液 100 g 常温离心 2 分钟，尽量去除上清。

注：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头；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；降速过快，可能导致管底原生质体悬起。建议升速和降速分别都使用 3。

5. 第二次收集：

加入 2-5 ml 1 \times 漂洗溶液，用剪尖的蓝吸头重悬原生质体，冰浴 30 分钟，原生质体在重力

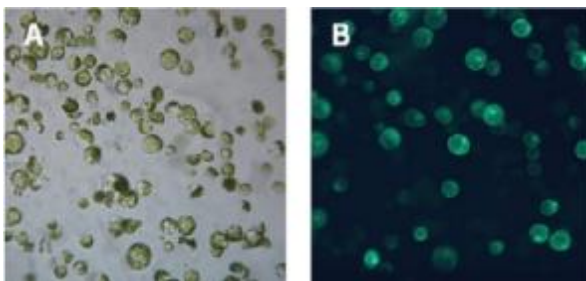
作用下可以沉降到离心管底部，尽量吸除上清，收集原生质体。(如果发现原生质体沉降的速度比较慢或者得率比较低，也可以考虑常温 100 g 离心 1-2 min 收集原生质体)。

6. 重悬:

小心去除上清溶液，不要触动原生质体沉淀，沉淀用剪尖的蓝吸头重悬于 1 ml 溶液 III 中即为原生质体溶液。(可以用血球计数板计数，根据原生质体数量调整溶液 III 的加入体积，使得原生质体密度为 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 或更高)。

注：制备好的原生质体可以在 4°C 或冰浴保存至少 24 h。

二、实验示例:



使用植物原生质体制备试剂盒转染拟南芥原生质体的效果图。

实验步骤：称取 0.48 g 转化试剂于 2 ml 离心管中，加入转化试剂溶解液后，颠倒混匀，蒸馏水定容至 2 ml，使转化试剂充分溶解后备用。在 2 ml 的圆底离心管中加入 10 μl (20 μg) EGFP 质粒 (植物用绿色荧光蛋白)，加入 100 μl 制备好的原生质体，轻柔混匀后加入 110 μl 当日配制好的转化试剂溶液，轻柔混匀，常温静置 5 min 后加入 440 μl 1 \times 漂洗溶液终止转化，轻轻颠倒混匀，常温 100 g 离心 1 min，去除上清，再加入 0.5 ml 1 \times 漂洗溶液，轻柔重悬原生质体，常温 100 g 离心 1 min 后，尽量去除上清，收集原生质体。加入 1 ml 溶液 V，小心重悬原生质体后水平放置 25°C 培养过夜(约 16h)，次日于荧光显微镜下检测 EGFP 荧光信号。

三、产品发表文章:

1. TaEXPB7-B,a-expansin gene involved in low-temperature stress and abscisic acid responses, promotes growth and cold resistance in *Arabidopsis thaliana*.

Xu Feng, Yongqing Xu, Lina Peng, Xingyu Yu, Qiaoqin Zhao, Shanshan Feng, Ziyi Zhao, Fenglan Li, Baozhong Hu.

J Plant Physiology 2019 <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.153004>

2. Involvement of the chloroplast gene ferredoxin 1 in multiple responses of *Nicotiana benthamiana* to Potato virus X infection.

Xue Yang, Yuwen Lu, Fang Wang, Ying Chen, Yanzhen Tian, Liangliang Jiang, Jiejun Peng, Hongying Zheng, Lin Lin, Chengqi Yan, Michael Taliansky, Stuart MacFarlane, Yuanhua Wu, Jianping Chen, Fei Yan.

Journal of Experimental Botany, 2020, 71 (6) 2142–2156, doi:10.1093/jxb/erz565