

## 大豆原生质体制备及转化试剂盒 使用说明书

### (2019 第 1 版)

产品编号：PPT151-5T/10T（由 A 盒和 B 盒组成）

储存条件：A 盒，-20 °C 储存；B 盒，常温储存。

产品组成：

组份编号		组分名称	5T	10T	储存温度
A 盒	PPT151-1	溶液 I	80 mL	80 mL×2	-20 °C
	PPT151-2	Cellulase R10	1.5 g	3.0 g	
	PPT151-3	Macerozyme R10	0.75 g	1.5 g	
	PPT151-4	BSA (10%)	2.5 mL	2.5 mL	
	PPT151-5	AMP (100 mg/mL)	1 mL	1 mL	
	PPT151-6	溶液 V-W5 (含 BSA)	20 mL	40 mL	
B 盒	PPT151-7	溶液 II-W5	100 mL×2	100 mL×4	RT
	PPT151-8	溶液 III-MMg	10 mL	20 mL	
	PPT151-9	溶液 IV-PEG	2.5 mL	5 mL	
	PPT151-10	还原剂 (β-me)	100 μL	100 μL	
	PPT151-11	细胞筛	5 个	10 个	
说明书			1 份		

产品简介：

本试剂盒主要通过纤维素酶和离析酶溶液消化植物细胞壁获得原生质体。适用于从 7~12 天的大豆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，研究蛋白的转录调控等。

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 20 mL 酶解液的使用量，可供 5 次 (5T) /10 次 (10T) 实验。

## 使用说明：

### 一、准备工作

#### 1. 需要准备的材料（本试剂盒不提供）：

锋利刀片；血球计数板；50 mL 离心管；2 mL 离心管。

#### 2. 即用型酶解液配制

配制顺序	组分	20 mL 体积
第一步	溶液 I	16 mL
	Cellulose R10	0.32 g
	Macerozyme R10	0.16 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%)	200 μL
	β-巯基乙醇	7.14 μL
	Amp (100mg/mL)	10 μL
第四步	加去离子水定容	
第五步	过滤除菌	

### 二、原生质体的分离制备

- 在 28 °C 的黑暗环境中培养 7~12 天大豆黄化苗，至大豆幼苗第一片真叶完全展开。以真叶完全展开后 4 天的大豆的叶片作为大豆原生质体细胞制备的材料。
- 将 1 g 新鲜的大豆组织材料（样品量可适当增加）用锋利的刀片将材料切成大小约 0.5 mm 宽的细条。置于含有 20 mL 酶解液的三角瓶内，于黑暗条件下 100 rpm/min，28 °C 震荡酶解 10 h。
- 酶解后的产物用细胞筛过滤，用镊子或无菌枪头轻轻搅拌，充分释放原生质体，去除未消化的叶片组织。用 10 mL 预冷的溶液 II-W5 solution 冲洗酶解器皿和未消化的叶片 2~3 次，将所有的液体收集到 50 mL 离心管中。

**注：**操作过程中动作尽可能轻柔，避免剧烈震荡，防止原生质体破碎。

- 选用水平转头，100 g 离心 10 min，升速 3，降速 3，去除上清。

**注：**去除液体时最好用移液枪，避免直接倒。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. 加入 10 mL 预冷的溶液 II-W5 solution，用蓝枪头（剪掉尖端）轻轻悬起原生质体，100 g 离心 10 min，升速 3，降速 3，去上清。

6. 加入 1 mL 预冷的溶液 II-W5 solution，用蓝枪头（剪掉尖端）轻轻悬起原生质体，转移至 2 mL 圆底离心管，冰上静置 30 min。

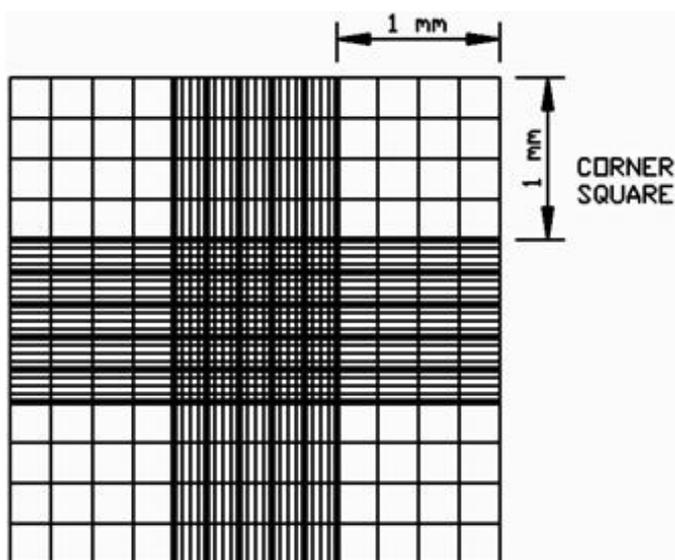
7. 显微镜下观察原生质体状态并计数。

**注：**原生质体呈现圆球形，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。如果细胞量较少（少于  $2 \times 10^5$  个/mL），可以将所有细胞用于 1~2 个转化体系。

8. 100 g 离心 10 min，升速 3，降速 3，去上清，用相应体积的溶液 III-MMg solution 溶液重悬原生质体，使原生质体浓度为  $2 \times 10^5$  个/mL。

#### 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  $\mu$ 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。



### 三、原生质体的转化

1. 在 2 mL 的圆底离心管中加入 20  $\mu$ L (10~20  $\mu$ g) 纯化后的质粒，随后加入 200  $\mu$ L 已调整好浓度的原生质体，轻轻混匀，再加入 220  $\mu$ L 的溶液 IV-PEG solution，轻柔旋转离心管，使用蓝枪头（尖端剪掉）轻轻吸打，直至混匀，此过程应避免产生气泡，28  $^{\circ}$ C 弱光培养 20 min，每 5 min 轻柔混匀。
2. 加入 0.5 mL 的溶液 II-W5 solution，轻柔混匀，终止转化。常温 100 g 离心 10 min，升速 3，降速 3，在不损失原生质体的情况下，尽可能去上清。
3. 加入 1 mL 的溶液 II-W5 solution 悬浮原生质体，常温 100 g 离心 10 min，升速 3，降速 3，去上清。

### 四、原生质体的培养和收集

1. 加入 1 mL 的溶液 V-W5（含 BSA）培养液悬浮细胞。将离心管水平放置将离心管水平放置，28  $^{\circ}$ C 弱光培养 16 h。
2. 收集细胞时，缓慢将离心管拿起，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几分钟后离心，100 g 离心 10 min，升速 3，降速 3，去除大部分溶液 V-W5（含 BSA），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的轻柔。
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平角转头。
3. 实验过程中尽可能使用剪尖蓝枪头（1 mL 吸头），因为其尖端的孔径较大；或把黄色枪头的尖端剪掉，保证平滑。