



## 植物原生质体转化试剂盒

Ver. 720965

货号	名称	包装
RTU4092	植物原生质体转化试剂盒	40 次

### ● 产品组成:

序号	组分货号	名称	规格	贮存	运输
1	RTU4092-01	转化终止溶液	50 ml	-20℃	RT
2	RTU4092-02	转化试剂	5 ml	-20℃	RT
3	RTU4092-03	培养溶液	50 ml	-20℃	RT
4		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。植物原生质体转化试剂盒(Plant Protoplasts Transformation Kit)采用的是聚乙二醇转化方法，借助聚乙二醇短时间内对原生质体产生的冲击效应，使质粒 DNA、RNA 或蛋白得以进入原生质体，经转化的植物原生质体经过一定时间培养后，可用于检测外源基因的表达和功能，转化后基因敲除或基因编辑效果等。

对于拟南芥原生质体，使用本试剂盒转化质粒后通常 2-6 小时可以检测相关基因的转录变化(mRNA 等 RNA 的变化)，通常 2-16 小时后可以检测到相关蛋白表达的变化，通常 24 小时可以检测到基因编辑的效果。

本试剂盒可以用于相当于 6 孔板 40 个孔的样品，12 孔板 20 个孔的样品，或 24 孔板 40 个孔的样品的转化。

本试剂盒不含有原生质体制备试剂，需要制备原生质体请参见植物原生质体制备试剂盒 (RTU4082)。

### ● 贮存和效期:

按照温度贮存，有效期一年。转化试剂现用现配。

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；50ml 离心管；2 ml 离心管；水浴锅

#### 一、原生质体转化步骤:

##### 1. 转化溶液配制:

植物原生质体转化参考下表根据样品量配制转化溶液。

**转化溶液现用现配。**转化溶液需要在转化前至少 1 小时配制，以确保转化试剂溶解充分。

**转化溶液配制后尽量当天使用。**配制好的转化溶液 4℃ 保存 3-5 天之内仍然有较好的转化效率，但和当天配制的转化溶液相比，转化效果可能会有一定程度的下降。

	120 $\mu$ l (1 个样品)	1.2 ml (10 个样品)	5 ml (约 40 个样品)
转化试剂粉末	48 mg	480 mg	2 g
转化试剂溶解液 (2 $\times$ )	60 $\mu$ l	0.6 ml	2.5 ml
灭菌水	定容至 120 $\mu$ l	定容至 1.2 ml	定容至 5 ml

## 2. 准备质粒:

取 10  $\mu\text{l}$  质粒 DNA(10-20  $\mu\text{g}$ , 浓度为 1-2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )于 2 ml 离心管中。

注: 质粒大小建议为 5-10 kb, 质粒浓度为 1-2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  左右; 原生质体转化对于质粒的纯度要求较高, 尽量使用高纯度的质粒。多个质粒同时转化时的体积和总质量保持不变。多个质粒转化时, 每种质粒的用量比例, 需要酌情自行调整。质粒转化也可以在 12 或 24 孔板中进行, 转化体系也可以按照比例放大或缩小。本试剂盒中描述的用量相当于是 6 孔板中的用量。原生质体用多孔板培养时, 最好选择未经表面处理的多孔板。对于经过表面处理的动物细胞培养用多孔板, 可以使用 5%胎牛血清或小牛血清处理孔表面数秒, 这样有助于减小孔底表面对于原生质体的损伤。

## 3. 质粒转化:

3.1 质粒管中加入 100  $\mu\text{l}$  原生质体溶液 (原生质体密度为  $2 \times 10^5/\text{ml}$ , 约 2 万个原生质体), 轻柔混匀。

3.2 加入等体积即 110  $\mu\text{l}$  步骤 1 事先准备好的转化溶液, 轻弹管底, 轻柔混匀, 常温 25 $^{\circ}\text{C}$  放置 5-15 分钟。

注: 最长可以孵育 15 min, 但通常孵育 5min 时间已经足够。最佳的孵育时间对于不同的原生质体和不同的质粒需要通过实验摸索。

## 4. 终止转化:

加入 2 倍体积转化终止溶液即 440  $\mu\text{l}$ , 轻柔彻底混匀, 终止转化过程。

## 5. 收集原生质体:

常温 100 g 离心 1-2 分钟, 尽量去除上清。

注: 由于转化后的溶液会非常粘稠, 加入转化终止溶液后离心 1 min 通常可以使原生质体聚集在管底, 但使用某些突变体时为减少原生质体损失, 可将离心时间延长到 2 min。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。

## 6. 原生质体漂洗:

加入 500  $\mu\text{l}$  转化终止溶液轻轻重悬原生质体, 常温 100g 离心 1 min, 尽量去除残留的上清。

注: 本步骤可以充分去除残留的转化试剂溶液中的组分, 避免转化试剂溶液中的组分对于后续的不良影响。

## 7. 原生质体重悬:

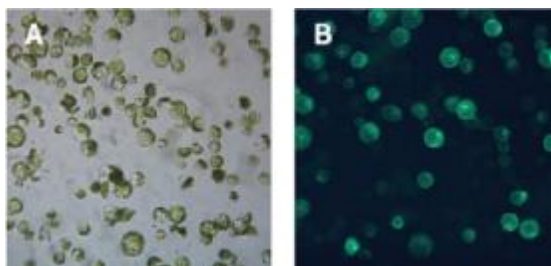
沉淀中加入 1 ml 培养溶液, 轻柔重悬。

## 8. 原生质体培养:

将离心管水平放置, 23-25 $^{\circ}\text{C}$  弱光培养。

注: 根据实验需求确定孵育时间。RNA 分析孵育 2-6 小时; 酶活性分析和蛋白标记实验孵育 2-16 小时; 基因编辑的效果在转化 24 小时后可能被检测到。

## 二、 实验示例:



使用植物原生质体转化试剂盒转化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 1.2 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  $\mu\text{l}$  (20  $\mu\text{g}$ ) EGFP 质粒 (植物用绿色荧光蛋白), 加入 100  $\mu\text{l}$  制备好的原生质体, 轻柔混匀后加入 110  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  转化终止溶液终止转化,

轻轻颠倒混匀，常温 100 g 离心 1 min，去除上清，再加入 0.5 ml 转化终止溶液，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 培养溶液，小心重悬原生质体后水平放置 25℃ 培养过夜(约 16h)，次日于荧光显微镜下检测 EGFP 荧光信号。