



Toll-free:400-611-2007

Order:010-62617225 62979301

Email:zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com



版本号:2026-3-18

# 生菜原生质体制备与转化试剂盒

目录号: ZX203

组成	名称	ZX203-1 (5T)	储存温度
A盒	酶解缓冲液EB	25mL×2	-20°C
	酶E1	0.4g	
	酶E2	0.2g	
	BSA(10%)	1mL	
	AMP(100mg/mL)	50μL	
B盒	培养液CS	125mL×3	常温
	重悬液RS	15mL	
	转化液TS	10mL	
	细胞筛	5个	
	刀片	5片	
	说明书	1份	

## ■ 运输及储存条件

A盒为冰袋运输, B盒为常温运输; 收货后, A盒: -20°C储存, B盒: 室温储存。

## ■ 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生菜叶片的细胞壁, 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。

实验室使用, 仅用于科研

北京庄盟国际生物基因科技有限公司  
Beijing Zoman Biotechnology Co., Ltd.



## ■ 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0.22um过滤器过滤后使用，大量污染丢弃。
6. A盒中的溶液需要室温融化后使用，亦可37°C水浴加速融化。

## ■ 操作步骤

### 实验准备

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	0.075g
	酶E2	0.03g
第二步	搅拌溶解，55°C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）	

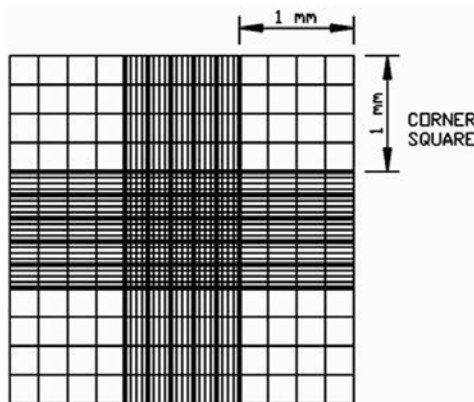
注：

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°C水浴完全溶解后，冷却至室温待用。

## 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  $\mu\text{L}$ （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. 30 min 后，原生质体将自然沉降于管底。若沉降不彻底，可采用 150 g 离心 2 min，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 $2 \times 10^5$ /mL 以上（加入重悬液的体积=100  $\mu$ L  $\times$  转化数，并多预留 200  $\mu$ L）。

## 原生质体的转化

1. 在冰浴期间准备：在 2 mL 灭菌圆底离心管中加入体积 10  $\mu$ L、总量 2-10  $\mu$ g 的质粒（建议使用去内毒素质粒；体积不足用无菌 ddH<sub>2</sub>O 补足；大的质粒，则用 10  $\mu$ g，比如 GFP 融合质粒）。
2. 向 2 mL 离心管中（已加入 10  $\mu$ L 质粒）加入 100  $\mu$ L 重悬后的原生质体，轻轻拍打混匀。
3. 加入 110  $\mu$ L 转化液 TS，轻轻拍打混匀并计时，室温避光孵育 15 min。  
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  $\mu$ L 培养液 CS，立即轻柔上下颠倒混匀以终止转化反应。
5. 将离心机头转换为 2 mL 的小转头，150g 离心 3 min，加速、减速加速度为 3。在不损失原生质体的情况下，用 200  $\mu$ L 枪头尽可能吸走上清。
6. 加入 1 mL 培养液 CS，轻轻拍打重悬原生质体。150g 离心 3 min，加速、减速加速度为 3。小心吸走上清。
7. 加入 1 mL 培养液 CS，轻轻混匀后平置离心管，28°C（或室温）暗培养 12-16 hrs（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 3 min 后再离心，150g 离心 3 min，加速、减速加速度为 3，去除大部分培养液，仅留底部 100  $\mu$ L，用于后续实验。用去尖黄枪头吸取 10  $\mu$ 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）。