

植物原生质体转染试剂盒

产品编号	产品名称	包装
C0563S	植物原生质体转染试剂盒	100次
C0563M	植物原生质体转染试剂盒	500次

产品简介:

- 碧云天生产的植物原生质体转染试剂盒(Plant Protoplasts Transfection Kit), 可用于将质粒、Cas9/sgRNA等蛋白和RNA转染进入植物原生质体内, 经转染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, 或者转染后的基因下调、基因敲除或基因编辑效果等。
- 对于拟南芥原生质体, 使用本试剂盒转染质粒后通常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。
- 植物原生质体是开展一系列植物细胞研究的重要材料, 可以用于如将DNA、RNA或者蛋白通过电击法(electroporation)、显微注射(microinjection)或聚乙二醇法介导的转染(PEG-mediated transfection)等。本试剂盒采用的是一种优化的聚乙二醇转染方法, 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, 具有使用便捷、转染效率高优点。
- 本试剂盒可与碧云天生产的植物原生质体分离试剂盒(C0362)配合使用, 完成一些模式生物如拟南芥原生质体外源基因的短时间或长期表达或者内源基因的关闭、下调或编辑等。
- 使用本试剂盒将植物EGFP表达质粒转染拟南芥原生质体的效果如图1所示。图中可见可以获得非常高的转染效率。

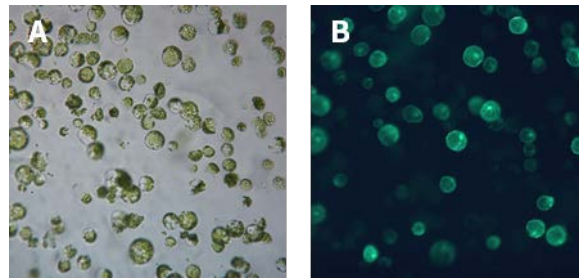


图1. 使用碧云天植物原生质体转染试剂盒(Plant Protoplasts Transfection Kit)转染拟南芥原生质体的效果图。对于使用碧云天的植物原生质体分离试剂盒(C0362)获得的拟南芥叶片原生质体, 参考如下体系制备转染试剂溶液: 称取0.48g转染试剂于2ml离心管(FCT121)中, 加入300 μ l溶液A、480 μ l溶液B, 颠倒混匀, 使转染试剂充分溶解后备用(足够用于10个后续的10个样品的转染)。在2ml的圆底离心管(FTUB019)中加入20 μ g p35SPPDK-EGFP-Flag (植物用绿色荧光蛋白) (D2627), 加入100 μ l制备好的原生质体, 轻柔混匀后加入110 μ l当日配制好的转染试剂溶液, 轻柔混匀, 室温静置5min后加入440 μ l终止液, 轻轻颠倒混匀, 室温100g离心1min, 去除上清, 再加入0.5ml终止液, 轻柔重悬原生质体, 室温100g离心1min后, 尽量去除上清, 收集原生质体。加入1ml培养液, 小心重悬原生质体后将其平置25 $^{\circ}$ C培养过夜(约16h), 次日于荧光显微镜下检测EGFP荧光信号。上图为实际检测的明场和荧光照片。

- 一个小包装(C0563S)的本试剂盒可以用于相当于6孔板100个孔的样品, 12孔板200个孔的样品, 或24孔板400个孔的样品的转染。
- 一个中包装(C0563M)的本试剂盒可以用于相当于6孔板500个孔的样品, 12孔板1000个孔的样品, 或24孔板2000个孔的样品的转染。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
C0563S-1	转染试剂	5g
C0563S-2	溶液A	3ml
C0563S-3	溶液B	5ml
C0563S-4	终止液	100ml
C0563S-5	培养液	100ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
C0563M-1	转染试剂	25g
C0563M-2	溶液A	15ml
C0563M-3	溶液B	25ml
C0563M-4	终止液	500ml
C0563M-5	培养液	500ml
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C 保存，一年有效。转染试剂可以室温或 4°C 保存。1-2 周内多次使用可以 4°C 保存。

注意事项：

- 请按照试剂盒要求的保存条件存放相关试剂，使用时请将各溶液充分融解并混匀。
- 本试剂盒使用时，需要按照无菌操作要求规范进行，避免微生物污染。培养液可适当分装后保存。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 转染试剂溶液的配制。

对于原生质体样品(每个样品为2万个原生质体)的质粒转染，参考下表根据样品量配制转染试剂溶液，配制后室温存放备用。转染试剂溶液需要在转染前至少1小时配制，以确保转染试剂溶解充分。转染试剂溶液配制后尽量当天使用。配制好的转染试剂溶液室温保存5天之内仍然有较好的转染效率，但和当天配制的转染试剂溶液相比，转染效果可能会有一定程度的下降。

试剂	用量(1 个样品)	用量(5 个样品)	用量(10 个样品)	用量(20 个样品)
转染试剂	48mg	240mg	480mg	960mg
溶液A	30μl	150μl	300μl	600μl
溶液B	48μl	240μl	480μl	960μl
Total volume	120μl	600μl	1.2ml	2.4ml

2. 质粒DNA转染：

- 取10μl质粒DNA(10-20μg)于2ml圆底离心管中。质粒大小建议为5~10kb，质粒浓度为1~2μg/μl左右。
多个质粒同时转染时的体积和总质量保持不变。多个质粒转染时，每种质粒的用量比例，需要酌情自行调整。质粒转染也可以在12或24孔板中进行，转染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。
- 加入100μl浓度约为 2×10^5 /ml的原生质体悬浮液(共约2万个原生质体)，轻轻混匀。
- 加入110μl至少提前1小时配制好的转染试剂溶液，轻轻弹击离心管底部，以充分混匀。
- 25°C静置孵育5min。最长可以孵育15min，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。
- 加入440μl的终止液，轻轻混匀，25°C 100g离心1-2min，尽量去除上清，收集原生质体。由于转染液非常粘稠，本步骤加入终止液后离心1min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，可将离心时间延长至2min。
- 加入500μl终止液轻轻重悬原生质体，25°C 100g离心1min后去除上清，尽量去除残留的上清。本步骤可以充分去除残留的转染试剂溶液中的组分，避免转染试剂溶液中的组分对于后续的不良影响。
- 加入1ml培养液，小心重悬原生质体，随后将离心管平置，23-25°C弱光培养。
- 根据具体的实验设计，可以在转染后2-6小时或更长时间，检测相关的RNA，可以在转染后2-16小时或更长时间，检测相关的蛋白或酶活性。基因编辑的效果在转染24小时后就可能被检测到。

3. Cas9/sgRNA等蛋白和RNA的转染。

- 取200μl浓度约为 1×10^6 /ml的原生质体(共约20万原生质体)悬浮溶液加至1.5ml离心管，加入3.3μl或10μl Cas9 (6μg/μl)和sgRNA (2.2μg/μl for each sgRNA)，轻轻混匀，加入200μl提前配制好的转染试剂溶液，轻轻混匀，25°C静置孵育5-20min。其它蛋白或RNA的转染可以参考进行。最佳的孵育时间需要根据特定的实验条件适当摸索。
- 加入800μl终止液，轻轻混匀，25°C 100g离心5min，尽量去除上清，收集原生质体。
- 加入1ml终止液，轻轻重悬原生质体，25°C条件下100g离心2min后，尽量去除上清。
- 用1ml培养液轻轻重悬原生质体，将其平置23-25°C培养过夜(16-24h)。转染24小时后就很可能检测到基因编辑产生的插入或缺失突变(Indel)。采用其它适当的培养液对于基因编辑的效果可能更好，例如Modified KM 8p liquid medium with 400 mM glucose等。

常见问题：

1. 转染效率低。

- 转染试剂溶液的质量对于转染效率的影响较大。转染试剂溶液应现用现配，不能高温高压灭菌，并且需要确保转染试剂充分溶

解。

- b. 原生质体转染对于质粒的纯度要求较高，需要尽量使用高纯度的质粒。
- c. 由于质粒的大小会对转染效率产生影响，可通过预实验摸索转染时不同大小质粒的用量与原生质体的比例。
- d. 原生质体质量对转染效果影响很大，建议使用生长健康的植物如拟南芥的嫩绿叶片进行原生质体分离。通常原生质体如果在转染和培养的过程中发生破碎的现象，会严重影响转染效果。原生质体发生破碎和制备原生质体的样品生长状态欠佳、制备步骤出现问题或后续转染时操作不当(例如和转染试剂溶液孵育时间过长等)有关。

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
C0362S	植物原生质体分离试剂盒	5ml×20次
C0563S	植物原生质体转染试剂盒	100次
C0563M	植物原生质体转染试剂盒	500次
D2489-1μg	pRD29B-luc (植物报告基因质粒)	1μg
D2489-100μg	pRD29B-luc (植物报告基因质粒)	100μg
D2491-1μg	pUBI10-GUS (植物报告基因质粒)	1μg
D2491-100μg	pUBI10-GUS (植物报告基因质粒)	100μg
D2627-1μg	p35SPPDK-EGFP-Flag (植物用绿色荧光蛋白)	1μg
D2627-100μg	p35SPPDK-EGFP-Flag (植物用绿色荧光蛋白)	100μg
P0043-100ml	植物 Western 及 IP 细胞裂解液	100ml
P0045-100ml	植物 RIPA 裂解液(强)	100ml

Version 2020.07.22