

# 植物原生质体制备试剂盒

(适用于单细胞测序)

使用说明书

## 目 录

目 录.....	2
I 产品概述.....	3
1. 产品组分.....	3
2. 自备材料.....	3
3. 适用范围.....	3
II 实验步骤.....	4
注意事项.....	5



## I 产品概述

“植物原生质体制备试剂盒（5rxn）”可用于多种植物组织的原生质体制备。植物原生质体是除去细胞壁后被原生质所包裹的“裸露细胞”，是目前开展基础研究的理想材料。本试剂盒采用酶解法来分离植物原生质体，因植物细胞壁主要由纤维素、半纤维素、果胶构成，故我们采用纤维素酶及含高果胶酶、半纤维素酶活性的离析酶来降解细胞壁，再经纯化后，可得到大量的植物原生质体。

本产品可以高效的处理众多类型的植物组织样本，并且已经预先配置好高质量的酶溶液，不仅使用方便，还可以得到高活性、高得率的单细胞悬液。本产品的组分都经过严格的质量控制和功能验证，在最大程度上保证单细胞悬液的有效制备的同时，也能保持实验数据的准确性和可靠性，以应用于下游的 scRNA-seq (Single-Cell RNA sequencing) 实验。

### 1. 产品组分

名称	含量
酶解液	27mL
W5 缓冲液	58mL

### 2. 自备材料

1. 带有能容纳 15mL 离心管的水平转子的离心机；
2. 恒温混匀仪；
3. 荧光显微镜；
4. 滤网：孔径 40 $\mu$ m；
5. 培养皿：直径 35mm；
6. EP 管：15mL 、 50mL；
7. 一次性滴管、双面刀片等。

### 3. 适用范围

本产品适用于水稻、玉米等多种植物组织的原生质体制备。经本公司长期验证，适用的组织类型包括：叶片、根尖等。



## II 实验步骤

1. 将试剂盒中的酶解液从 4°C 中取出，与室温保存的 W5 缓冲液一起取出待用。
2. 将新鲜的实验材料从植株上取下，用水冲洗两遍，将表面灰尘冲洗干净。
3. 将组织置于培养皿中润湿的滤纸上，在镊子的辅助下用双面刀片将组织切成约 0.5mm 的碎块，转移至有 2-5mL 酶解液的 35mm 小培养皿中。

**\*酶解液需根据植物组织具体量多少酌情添加。**

4. 将转移后的培养皿置于恒温混匀仪中 37°C，200rpm 避光消化，每隔 30min 观察消化液及组织状态，若组织沉入消化液底部且消化液呈现浑浊状，则在显微镜下进行抽检，估算原生质体的得率。

5. 将 40 $\mu$ m 筛网组装到 50mL EP 管上。先用少量 W5 缓冲液润筛，再向盛有组织的培养皿中补加满 W5 溶液，总体积约 7mL，用一次性滴管慢慢搅拌混匀。待组织沉入底部，将培养皿中上清吸出（尽量不要吸到组织），倾斜滴管，缓缓成滴过筛。

6. 用 3mL 的 W5 缓冲液清洗一遍培养皿，操作同上，过筛后总体积约在 10mL，用 2 个 15mL EP 管平分，每管 5mL。

7. 将过筛后的 2 管滤液用水平转子 25°C，100 $\times$ g 离心 7min，以富集原生质体。

8. 200 $\mu$ l W5 缓冲液将两管原生质体沉淀悬起合并混匀后，镜检，再补加 W5 缓冲液至 5mL，使用水平转子，25°C，100 $\times$ g，离心 7min 洗涤。

9. 小心的将上清全部吸出，尽可能不要留有残余上清液。依据镜检估算到的原生质体数量，使用 W5 缓冲液重悬原生质体沉淀，镜检计数至所需浓度。



## 注意事项

1. 本试剂盒仅适用于科研，不适用于临床检测。
2. 尽量避免试剂的反复冻融，建议到货后分装保存。
3. 双面刀片切割植物组织时要干脆迅速，避免反复切割对植物组织造成伤害。
4. 筛网过滤时需控制溶液流速，缓缓成滴过筛，防止堵塞。
5. 全程离心机操作必须在 21-25℃条件下离心。

