CPW 酶解液、CPW 洗液、CPW 母液、CPW 密度梯度离心液通用版产品介绍：

1. CPW 为植物原生质体制备分离过程中常用的基础盐。

2. 不用的 CWP 含有不同的渗透压稳定剂，也有不同的用途。

3. 不同的植物样品，最适甘露醇浓度不一，请根据需求选择或者定做。

产品名称	货号	说明
2×CPW 母液/原生质体洗液(不含甘露醇)	PPT5000	只含基础盐，蔗糖甘露醇自主添加
5% CPW 洗液/原生质体洗液	PPT5005	含 5%的甘露醇
9% CPW 洗液/原生质体洗液	PPT5009	含 9%的甘露醇
13% CPW 洗液/原生质体洗液	PPT5013	含 13%的甘露醇，最常用
25% CPW 密度梯度离心液（25%蔗糖）	PPT5024	含 25%蔗糖，用于原生质体离心纯化
X% CPW 洗液/原生质体洗液(可定制)	PPT50X	自由选择甘露醇以及蔗糖含量
CPW 洗液/原生质体洗液(0.7M 甘露醇)	PPT500X	含 0.7M 的甘露醇
CPW 酶解液（不含酶，可定制）	PPT501X	自由选择甘露醇浓度

使用说明举例：（仅供参考）

植物原生质体是除去细胞壁后为原生质所包围的“裸露细胞”，是开展基础研究的理想材料。其中酶解法分离原生质体是一个常用的技术，其原理是植物细胞壁主要由纤维素、半纤维素和果胶质组成，因而使用纤维素酶、半纤维素酶和果胶酶能降解细胞壁成分，除去细胞壁，即可得到原生质体。由于原生质体内部与外界环境之间仅隔一层薄薄的细胞膜，必须保持在渗透压平衡的溶液中才能保持其完整性。其次,还应当考虑取材、酶的种类和纯度、酶液的渗透压、酶解时间及温度等因素对分离原生质体的影响。测定原生质体的活性有多种方法。荧光素双醋酸酯(FDA)染色是常用的一种方法,FAD 本身无荧光,无极性，可透过完整的原生质膜。一旦进入原生质体后,由于受到酯酶分解而产生具有荧光的极性物质荧光素。它不能自由出入原生质膜,因此有活力的细胞能产生荧光,无活力的原生质体不能分解 FAD 无荧光产生。许多化学、物理学和生物学方法可诱导原生质体融合，现在被广泛采用并证明行之有效的融合方法是聚乙二醇（PEG）法、高钙高 pH 法和电融合法；聚乙二醇（PEG）作为一种高分子化合物，20～50％的浓度能对原生质体产生瞬间冲击效应，原生质体很快发生收缩与粘连，随后用高钙高 pH 法进行清洗，使原生质体融合得以完成。

聚乙二醇（PEG）诱导如何的机理：聚乙二醇（PEG）由于含有醚键而具有负极性，与水、蛋白质和碳水化合物等一些正极化基团能形成氢键，当聚乙二醇（PEG）分子足够长时，可作为临近原生质表面之

间的分子桥而使之粘连、聚乙二醇（PEG）也能连接钙等阳离子，钙可在一些负极化基团和聚乙二醇（PEG）之间形成桥，因而促进粘连。从而引起原生质体融合：高钙高 pH 由于增加了质膜的流动性，因而也大大提高了融合频率，洗涤时渗透压冲击也可能起作用。原生质体分离纯化后，在适当的培养基上应用合适的培养方法，能够再生细胞壁，并启动细胞持续分裂，直至形成细胞团，长成愈伤组织或胚状体，再分化发育成苗。其中，选择合适的培养基及培养方法时原生质体培养中最基础也是最关键的环节。PEG 为一种高分子化合物，能与水、蛋白质、和碳水化合物等一些基团能形成氢键。普遍认为聚乙二醇分子能改变各类细胞的膜结构，使两细胞接触点处质膜的脂类分子发生疏散和重组，由于两细胞接口处双分子层质膜的相互亲和以及彼此的表面张力作用，从而使细胞发生融合。该方法的优点是：用法简单，容易获得融合体，融合效果好。

主要试剂

1. 20%蔗糖；

2. 13%CPW 洗液：

27.2mg/L 磷酸二氢钾（KH2PO4）

101.0mg/L 硝酸钾（KNO3）

1480.0mg/L 两个结晶水的氯化钙（CaCl22H2O）

246.0mg/L 硫酸镁（MgSO4）

0.16mg/L 碘化钾（KI）

0.025mg/L 硫酸铜（CuSO4）

13%W/V 甘露醇

pH6.0

3. 酶液：

1% 纤维素酶

1% 果胶酶

0.7M 甘露醇

0.7mM 磷酸二氢钾（KH2PO4）

10mM 两个结晶水的氯化钙（CaCl22H2O）

pH6.8-7.0

4. 40% PEG 液：

40% PEG 液（MW 1500-6000）

0.3M 葡萄糖

3.5mM 两个结晶水的氯化钙（CaCl22H2O）

0.7mM 磷酸二氢钾（KH2PO4）。

主要设备

350 目网，离心机，试管，离心管，吸管，显微镜，恒温水浴锅。

实验材料

1. 韭菜或大蒜叶；

2. 红辣椒。

实验步骤

植物原生质体的分离与纯化：

1. 将撕去表皮的植物叶片或花瓣置于酶液（pH 6.9,去表皮面接触酶液），在 25℃黑暗条件下，酶解 1～2 小时。

2. 用 350 目网过滤除去未完全消化的叶片等残渣。

3. 在 1000rpm 条件下离心 5 分钟，弃上清液。 红辣椒 800 转/分离心 5 分钟。加入 3～4ml13%CPW 洗液，相同条件下离心 ，弃上清液。加 1ml13%CPW 洗液悬浮。

4. 蔗糖漂浮法去除碎片。

蔗糖漂浮方法：

1）用细口吸管吸 20%蔗糖溶液约 3ml，小心插入盛有原生质体悬液的离心管底部，缓缓将蔗糖溶液挤出，由于比重不同，蔗糖溶液与原生质体悬液中间有一明显界面(注意要有明显界面).

2) 离心 5 分钟（1000 转/分，辣椒 800 转/分），此时死细胞及碎片降至蔗糖溶液内，聚集在离心管底部，而活细胞由于有大量泡沫，故漂浮在上下界面处，

3) 用细管吸取漂浮在上下界面处的健康原生质体，转入干净的离心管中，加入 3～4ml13%CPW 洗液离心（镜检决定是否需要离心），离心 5 分钟（1000 转/分，辣椒 800 转/分），收集沉淀，最终原生质体体积控制在 0.5ML 左右。

细胞融合：

1. 不同的原生质体各 300μl 与带盖离心管中，另加入 300μl 40% PEG 液，30℃水浴中温浴 15min；

2. 融合液一滴于载玻片上(注意保持一定湿度，不能太干)，轻轻盖上盖玻片，显微镜观察。

实验结果：

用光学显微镜或倒置显微镜(高倍) 观察 2-3 个细胞靠近或融合的过程。（观察时注意不同程度的融合现象。通常分为五个阶段。①两细胞膜接触，粘连；②细胞膜形成穿孔；③两细胞的细胞质连通；④通道扩大，两细胞连成一体；⑤细胞完全合并，形成一个含有两个或多个核的圆形细胞。）