

Génétique

Kits

Réf :
115 056

Kit Obtention des protoplastes

Français – p 1

Version : 2210

1. Composition

- 1 microtube de tampon MES concentré (500 µl)
- 1 microtube de solution de chlorure de calcium (CaCl_2 1 mM)
- 1 pot de mannitol (13 g)
- 1 microtube de pectinase 0,2 g (4°C)
- 1 microtube de cellulase 1 g (4°C)

Le kit présente les réactifs en format pré-dosés et permet de réaliser 100 mL de solution enzymatique pour environ 20 binômes.

2. Précautions d'utilisation et de stockage



Le kit se conserve 12 mois après réception à +4°C.

3. Matériel complémentaire à prévoir

Matériel complémentaire	Cochez
Feuille de poireau bien verte	
Fiole 100 ml	
Eau distillée stérile	
Boîtes de Pétri	
Scalpel	
Pince	
Ciseaux	
Etuve ou incubateur	
Micropipette 2-20 µl + cône	
Verres de montre	
Lames	
Lamelles	
Microscope	

4. Introduction

Les protoplastes sont des cellules végétales dont la paroi a été éliminée par l'action d'enzymes cellulase et pectinase. Pour obtenir et conserver ces protoplastes, il faut les préparer et les mettre dans un milieu hypertonique qui leur permet de ne pas éclater. Ces cellules se prêtent à divers types d'expérimentation comme l'introduction de matériel génétique étranger, la fusion interspécifique...

Les feuilles de poireau ont été choisies pour leur grande résistance à la déshydratation et la couleur verte des protoplastes (ici des chloroplastes) très visibles pour une observation au microscope.

5. Protocole expérimental

5.1 Préparation de la solution d'extraction

- * Dans une fiole jaugée de 100 ml stérilisée (à l'autoclave) ajoutez :
 - 50 ml d'eau distillée stérile
 - 500 µl de MES
 - La solution de chlorure de calcium (CaCl_2 à 1 mM)
 - 13 g de mannitol
 - 0,2 g de pectinase
 - 1 g de cellulase

Complétez à 100ml avec l'eau distillée stérile.

5.2 Extraction des protoplastes

- * Verser la solution d'extraction dans une boîte de Pétri jusqu'à obtenir 2 mm d'épaisseur.
 - Enlever l'épiderme d'une portion de feuille de poireau sur une petite surface (1 cm²) à l'aide d'un scalpel et d'une pince fine
 - Découper le morceau dénudé et le poser dans la boîte de Pétri, face dénudée vers le bas. La solution enzymatique doit recouvrir la totalité de l'échantillon.
 - Répéter l'opération jusqu'à recouvrir la surface de la boîte de Pétri (Une dizaine de fragments environ).



- * Incuber 1h30 à 37°C ou 3h00 à 25°C.

Remarques : Pour obtenir un grand nombre de protoplastes, vous pouvez réaliser l'extraction la veille mais attention les protoplastes sont fragiles et peuvent se dégrader.

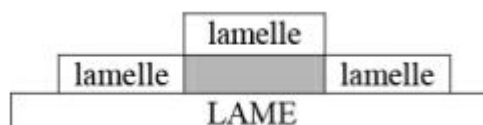
6. Observation

- * Il est nécessaire afin de préserver l'intégrité des protoplastes de fabriquer une chambre d'incubation composée d'une lame en verre et trois lamelles :

Sur une lame en verre, disposez deux lamelles de la façon suivante :



Déposez à l'aide d'une micropipette 20 µL de la solution de protoplasme entre les deux lamelles puis recouvrir d'une autre lamelle sans effectuer de pression (risque d'éclatement) :



Observez au grossissement X400.

Remarque : Pour une observation à un grossissement supérieur, la chambre d'incubation ne peut pas être utilisée (mise au point impossible, focale non adaptée). Vous pouvez réaliser une observation classique entre lame et lamelle en faisant attention à ne pas trop appuyer.

7. Service après-vente

Pour tous réglages, contacter le **Support Technique** au **09 69 32 02 10** (prix d'un appel local, non surtaxé).

Le matériel doit être retourné dans nos ateliers et pour toutes les réparations ou pièces détachées, veuillez contacter :

JEULIN – S.A.V.
468 rue Jacques Monod
CS 21900
27019 EVREUX CEDEX France

09 69 32 02 10*

** prix d'un appel local, non surtaxé*