

叶绿体提取试剂盒 使用说明书

产品编号: PTE010

产品储存: 2-8°C保存, 保质期一年。

产品说明:

本产品基于匀浆裂解出叶绿体粗提物, 后经密度梯度离心纯化出完整高纯叶绿体。

纯化出来的叶绿体可用于后续的光合作用, 电子链和磷酸化, 跨膜转运, 体外叶绿体蛋白合成, 蛋白定位等研究。还可用于的叶绿体膜, 基质, 类囊体, 叶绿体 DNA 和叶绿体 RNA 纯化。

本产品提供纯化 15 次的试剂量。每次处理叶片量约为 30g。

产品组成:

产品组成	PTE010-15T
5×匀浆液 (溶剂)	110mL×5
BSA	5g
5×重悬液	100mL
Pec11 细胞分离液(GE)	60mL
Mira cloth(millipore)-15cm×15cm	16 块
说明书	1 份

注意事项:

叶绿体对温度高度敏感, 所以整个操作必须在冰上或者在冷室进行, 所用器皿和溶液均需要在 4°C 预冷。离心时一定要在 4°C 进行, 离心力以 g 而不是 rpm 计算。为避免叶绿体活性降低, 尽量在 1h 内完成实验。如果需要研究叶绿体的功能, 提取过程还需要在昏暗的光线条件下进行。

使用方法:

(一) 试剂准备:

1. 匀浆液: 将自备的去离子水与 5×匀浆液按 4:1 的比例混合, 然后在混合液中加入 BSA 到终浓度 0.1% (每 100 mL 中加入 0.1 g BSA), 摇晃溶解后所得溶液即为匀浆液, 冰上预冷待用。一次实验 (从 30 g 叶片提取叶绿体) 所需要的匀浆液体积根据材料不同而不同。

2. 1×重悬液：将自备的去离子水与 5×重悬液按 4: 1（16mL+4mL）的比例混合。每次实验准备 20mL 的 1×重悬液备用。

（二）匀浆裂解：

1. 实验前 1-2 天将植物放在暗室培养以减少叶绿体中淀粉颗粒的形成，否则离心时这些颗粒很容易使叶绿体破裂。叶片在实验前需先用自来水洗净，再用蒸馏水淋洗，去掉多余水分。如果叶片采集后不能立即处理，则保存时需要保持叶片湿润，即使如此，叶片的放置时间也不能超过一天。

2. 新鲜采集植物叶片，快速去除叶脉并将叶片剪成 1-3 cm² 大小的碎片并浸泡在适量的预冷的匀浆液中（每克叶片加 4 mL 匀浆液，但对烟草和大豆，每克叶片需要加 6 mL 匀浆液）。

3. 将浸泡了叶片的匀浆液转移到 Waring 匀浆机（即家用制备果汁的匀浆机）中，低速匀浆 10 秒，避免起泡沫。用玻璃棒把液面的碎片按入匀浆机底部后，再低速匀浆 10 秒。

注意：除 Waring 匀浆机外，还可以选择 Dounce 玻璃匀浆器，Polytron 匀浆机和研磨（加玻璃珠）等裂解细胞的方法，但这些方法的单次处理量都比较小，需要将样品分成很多小份单独匀浆，然后再汇集。

4. 用 Miracloth(millipore) 过滤匀浆液，等分到 4 个预冷的 50 mL 的塑料离心管中（每个管中的滤液不要超过 35 mL）。

5. 在水平转子离心机上 4°C 200 g 离心 3 分钟（对菠菜，白菜和莴笋材料）或 400 g 离心 1 分钟（对甜菜材料），白色沉淀为未破裂的细胞或细胞核。

6. 将上清液（含叶绿体）转移到一个新的、预冷的 50 mL 塑料离心管中。

7. 在水平转子离心机上 4°C 1300 g 离心 7 分钟，小心弃上清，沉淀含叶绿体，呈浅绿色。

8. 在沉淀中加入 1.5 mL 预冷的 1×重悬液（配置方法），手弹离心管底部使叶绿体重悬。

注意：重悬时最好避免溶液起泡，也不要开枪头吹打，否则叶绿体容易破裂。沉淀下有白色淀粉属于正常现象，但重悬叶绿体时避免将白色淀粉重悬。

9. 将 4 管叶绿体重悬液汇集（共约 6 mL）。此溶液为叶绿体粗提产物，可直接用于后续的 SDS-PAGE, Western, ELSIA 和蛋白组分析。如果需要以之为材料精提叶绿体，就需要将破裂的叶绿体和完整的叶绿体分开，根据植物的不同，可选用下述两种密度梯度离心法之一进行分离。

（二）叶绿体纯化：

A：单浓度分离法（适合菠菜，白菜和莴笋等材料）：

1. 在 50 mL 塑料离心管中先加入 2mL 5×重悬液、4 mL percoll 细胞分离液和 4mL 去离子水，充分混合均匀。

2. 在其液面上小心铺上汇集得到的约 6 mL 叶绿体重悬液。

3. 在水平转子离心机上 4°C 1300g 离心 8 分钟，最上层的绿色带含破碎的叶绿体，线粒体和核糖体等，管底的绿色沉淀为完整的叶绿体。
4. 小心将上清倒出后，在叶绿体沉淀中加入预冷的 0.5 mL 1×重悬液，手指轻弹管底使之重悬。
5. 将叶绿体重悬液转移到 1.5mL 离心管中并避光保存。可在相差显微镜下检查叶绿体完整性。叶绿体必须尽快使用，否则非常容易失去活性。

B: 双浓度分离法（适合烟草，甜菜和大豆等材料）：

1. 在 14 mL 塑料离心管中加入 0.5 mL 5×重悬液 和 2 mL percoll 细胞分离液，充分混合均匀，得密度梯度重液。
2. 在另一离心管中加入 1 mL 5×重悬液、2 mL percoll 细胞分离液和 2mL 去离子水充分混合均匀，得密度梯度轻液。
3. 将密度梯度轻液小心铺在密度梯度重液之上，然后将第 9 步汇集得到的叶绿体重悬液中的 4 mL(还剩 2 mL，可以重复一次或备用)小心铺在密度梯度轻液之上。
4. 在水平转子离心机上 4°C 3750 g 离心 15 分钟，最上层绿色带含破碎的叶绿体、线粒体和核糖体等，重液和轻液间的绿色带为完整叶绿体。
5. 用广口吸管小心将重液和轻液之间的绿色带（叶绿体）转移到新的离心管中，加入三倍体积的预冷的 1×重悬液，轻柔混匀。
6. 在水平转子离心机上 4°C 1700 g 离心 1 分钟，小心将上清倒出后，在绿色的叶绿体沉淀中加入预冷的 0.5 mL 1×重悬液，手指轻弹管底使之叶绿体重悬。
7. 将叶绿体重悬液转移到 1.5 mL 离心管中并避光保存，也可在相差显微镜下检查叶绿体完整性。叶绿体必须尽快使用，否则非常容易失去活性。所得精提叶绿体可用于后续的光合作用，电子链和磷酸化，跨膜转运，体外叶绿体蛋白合成，蛋白定位等研究。还可用于的叶绿体膜，基质，类囊体，叶绿体 DNA 和叶绿体 RNA 纯化。