

植物叶绿体纯化试剂盒

Plant Chloroplast Isolation Kit

使用手册 V1.2

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

产品及特点	叶绿体是重要的，负责植物光合作用的细胞器，很多重要的特性(如雄性不育)也跟叶绿体相关，所以叶绿体是研究植物生理和母系遗传的重要材料。对植物叶绿体进行生化，遗传和分子生物学研究都需要进行叶绿体纯化。本产品就是基于密度梯度离心的，专门用于从植物叶片中纯化完整叶绿体的试剂盒。它具有下列特点： 1. 即用型试剂盒，用户不需要单独配制各种溶液。 2. 提供 AB 两种选择，A 型用于叶绿体粗提，所得叶绿体含少量其他细胞器污染，可用于后续的 SDS-PAGE，Western，ELISA 和蛋白组分析。B 型用于叶绿体精提，所得叶绿体完整，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。 3. 本产品足够 15 次提取，每次可处理 30g 叶片，能得到 5 mg 左右叶绿体。 4. 已经成功用于菠菜，大豆，莴笋，白菜，烟草和甜菜等植物，还可用于更多植物（可能需要优化条件）。			
规格及成分		成 份	编 号	大纸盒包装
		溶液 A 成分一	120308A1	250 mL×2
		溶液 A 成分二（干粉）	120308A2	3 g
		溶液 B	120308B	60 mL
		带柄尼龙滤膜	120308C	1 个
		使用手册	120308sc	1 份
运输及保存	常温运输和保存，试剂盒期限一年。			
自备试剂	去离子水。			
使用方法	注意：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℃预冷。离心时一定要在 4℃进行，离心力以 g 而不是 rpm 计算。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。 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（实验当天）制备溶液 A：将自备的去离子水与溶液 A 成分一按 4：1 的比例混合，然后在混合液中加入溶液 A 成分二干粉到终浓度 0.1%（每 100 mL			

中加入 0.1 g 干粉), 摇晃溶解后所得溶液即为溶液 A, 冰上预冷待用。一次实验 (从 30 g 叶片提取叶绿体) 所需要的溶液 A 体积跟材料不同而不同。溶液 A 不能长期保存, 需要现用现配。

3. 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溶液 A 中 (每克叶片加 4 mL 溶液 A, 但对烟草和大豆, 每克叶片需要加 6 mL 溶液 A)。
4. 将浸泡了叶片的溶液 A 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。
5. 用带柄尼龙滤膜过滤匀浆液, 可先将滤液收集到预冷的 200 mL 量筒中, 再等分到 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)。带柄尼龙滤膜后可反复使用。
6. 在水平转子离心机上 4℃ 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。
7. 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。
8. 在水平转子离心机上 4℃ 1000 g 离心 7 分钟, 小心弃上清, 沉淀含叶绿体, 呈浅绿色。
9. 在沉淀中加入 1.5 mL 预冷的溶液 A, 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, 也不要用力枪头吹打, 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。
10. 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, ELISA 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。
11. 单浓度分离法 (适合菠菜, 白菜和莴笋等材料):
 - a) 在 50 mL 塑料离心管中先加入 6 mL 溶液 A 成分一和 4 mL 溶液 B, 充分混合均匀。
 - b) 在其液面上小心铺上第 11 步汇集得到的约 6 mL 叶绿体重悬液。
 - c) 在水平转子离心机上 4℃ 1000 g 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。 d) 小心将上清倒出后，在叶绿体沉淀中加入预冷的 0.5 mL 溶液 A 成分一，手指轻弹管底使之重悬。 e) 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。 12. 双浓度分离法（适合烟草，甜菜和大豆等材料）： a) 在 14 mL 塑料离心管中先加入 0.5 mL 溶液 A 和 2 mL 溶液 B，充分混合均匀，得密度梯度重液。 b) 在另一试管中将 3 mL 溶液 A 和 2 mL 溶液 B 充分混合均匀，得密度梯度轻液。 c) 将密度梯度轻液小心铺在密度梯度重液之上，然后将第 10 步汇集得到的叶绿体重悬液中的 4 mL(还剩下 2 mL)小心铺在密度梯度轻液之上。 d) 在水平转子离心机上 4℃ 3200 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。 e) 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溶液 A 成分一，轻柔混匀。 f) 在水平转子离心机上 4℃ 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 溶液 A 成分一，手指轻弹管底使之叶绿体重悬。 g) 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。
关联产品	柱式植物叶绿体 DNAout （CAT#: 120406）