

天
净
沙
系
列

CAT#:130887-15

常温运输和保存, 但有 2 个低温成分

TIANDZ

植物叶绿体蛋白提取试剂盒

Plant Chloroplast Protein Extraction Kit

使用手册 V1.1

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

<p>产品及特点</p>	<p>本试剂盒是结合植物叶绿体纯化试剂盒和细菌蛋白质提取试剂盒而推出的新兴产品，专门用于植物叶绿体蛋白的快速提取。它具有下列特点：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 即用型试剂盒，用户不需要单独配制各种溶液。 2. 本产品足够 15 次提取，每次可处理 30g 叶片。 3. 得到的提取物可以直接用于 SDS-PAGE、2D 电泳、免疫印迹分析、蛋白活性测定和 BCA 法及 Lowry 法蛋白定量（不适用于 Bradford 法）。 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）。 																										
<p>规格及成分</p>	<table border="1" data-bbox="584 645 1426 1182"> <thead> <tr> <th>成份</th> <th>编号</th> <th>大纸盒包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>植物叶绿体纯化匀浆液成分一</td> <td>120308a1</td> <td>250 mL×2</td> </tr> <tr> <td>植物叶绿体纯化匀浆液成分二 (干粉)</td> <td>120308a2</td> <td>3 g</td> </tr> <tr> <td>Percoll</td> <td>131134</td> <td>60 mL</td> </tr> <tr> <td>带柄尼龙滤膜</td> <td>120308b</td> <td>1 个</td> </tr> <tr> <td>植物叶绿体蛋白提取溶液 A</td> <td>130887a</td> <td>15 mL</td> </tr> <tr> <td>植物叶绿体蛋白提取溶液 B</td> <td>130887b</td> <td>1.5 mL</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>130887sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>			成份	编号	大纸盒包装	植物叶绿体纯化匀浆液成分一	120308a1	250 mL×2	植物叶绿体纯化匀浆液成分二 (干粉)	120308a2	3 g	Percoll	131134	60 mL	带柄尼龙滤膜	120308b	1 个	植物叶绿体蛋白提取溶液 A	130887a	15 mL	植物叶绿体蛋白提取溶液 B	130887b	1.5 mL	使用手册	130887sc	1 份
成份	编号	大纸盒包装																									
植物叶绿体纯化匀浆液成分一	120308a1	250 mL×2																									
植物叶绿体纯化匀浆液成分二 (干粉)	120308a2	3 g																									
Percoll	131134	60 mL																									
带柄尼龙滤膜	120308b	1 个																									
植物叶绿体蛋白提取溶液 A	130887a	15 mL																									
植物叶绿体蛋白提取溶液 B	130887b	1.5 mL																									
使用手册	130887sc	1 份																									
<p>运输及保存</p>	<p>常温运输和保存，但植物叶绿体蛋白提取溶液 A 和植物叶绿体蛋白提取溶液 B 需要-20℃保存。保存期限一年。</p>																										
<p>自备试剂</p>	<p>去离子水</p>																										
<p>使用方法</p>	<p>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，提取还需要在昏暗的光线条件下进行。</p> <p>一：叶绿体的纯化</p> <ol style="list-style-type: none"> 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）制备匀浆液：将自备的去离子水与匀浆液成分一按 4：1 的比例混合，然后在混合液中加入匀浆液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跟材料不同而不同。

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）。
4. 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 预冷的匀浆液，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），得到叶绿体粗提液，可直接用于后续的 SDS-PAGE, Western, ELISA 和蛋白组分析。
11. 如果需要以之为材料精提叶绿体，就需要用密度梯度离心法将完整的叶绿体和其他污染物进一步分离。具体操作步骤是：在 50 mL 塑料离心管中先加入 6 mL 匀浆液成分一和 4 mL Percoll，充分混合均匀。在其液面上小心铺上叶绿体粗提液。在水平转子离心机上 4℃ 1000 g 离心 8 分钟，管底绿色沉淀为完整的叶绿体。小心将上清倒出后，用于叶绿体蛋白提取。

二：叶绿体蛋白质的提取

12. 将 1 mL 的溶液 A 和 100 uL 溶液 B 加入到叶绿体沉淀（约 15 mg 湿重）中，吹打混匀。

	<p>13. 冰上放置 30 分钟至 1 小时至溶液变清。</p> <p>14. 4℃ 1,2000 g 离心 1 分钟。</p> <p>15. 将上清液转移至一新的 1.5 mL 塑料离心管中即得到蛋白溶液，可置于 -70℃冰箱保存或立即使用。如果要进行 SDS-PAGE 电泳，可取部分样品到离心管中，加入 5×SDS-PAGE 上样缓冲液（终浓度为 1×），在沸水中处理 5 分钟后立即上样电泳。</p>
<p>关联产品</p>	<p>植物叶绿体纯化试剂盒（CAT#:120308）、BCA 蛋白定量试剂盒（CAT#:80815）</p>