



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

http:// www.real-tims.com.cn

E-mail: real-times@vip.163.com

柱式植物叶绿体提取试剂盒（微量样品）

Ver.731171

产品编号	产品名称	包装
RTU5004	柱式植物叶绿体提取试剂盒（微量样品）	50 次

● 产品简介：

叶绿体（Chloroplast）是质体的一种，是高等植物和一些藻类所特有的能量转换器，是光合作用的反应场所。在高等植物中叶绿体为双凸或平凸透镜，长径5~10 μ m，短径2~4 μ m，厚2~3 μ m。高等植物的叶肉细胞一般含50~200个叶绿体，可占细胞质的40%，叶绿体的数目因物种细胞类型，生态环境，生理状态而有所不同。叶绿体由叶绿体外被(chloroplast envelope)、类囊体(thylakoid)和基质(stroma)三部分组成，含有3种不同的膜：外膜、内膜、类囊体膜和3种彼此分开的腔：膜间隙、基质和类囊体腔。本公司的植物叶绿体提取试剂盒采用密度梯度离心方法，可以从多种植物中提取高纯度的叶绿体。

1. 即用型试剂盒，用户不需要单独配制各种溶液。
2. 不需要液氮研磨叶片，可以从50-100 mg材料中提取叶绿体，方便使用。
3. 试剂盒可以用于叶绿体粗提，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。也可以用于叶绿体精提，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。还可用于叶绿体膜，基质，类囊体的提取以及叶绿体DNA和叶绿体RNA纯化。
4. 以每次处理0.1 g叶片计算，本产品可使用50次提取，每次能得到70-90 μ g粗叶绿体或10-20 μ g精制叶绿体（叶绿素定量）。
5. 已经成功用于拟南芥，绿萝，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）。

注：本产品适合于少量叶片（50-100 mg）叶绿体的提取，大量叶片叶绿体提取（每次处理30 g叶片）请选择RTU5001 植物叶绿体提取试剂盒。

● 贮存及运输：

4-8 $^{\circ}$ C保存；有效期一年；常温运输。

● 产品组成：

产品货号	产品名称	包装	贮存
RTU5004-01	提取缓冲液	25 ml	4-8 $^{\circ}$ C
RTU5004-02	漂洗缓冲液	100 ml	4-8 $^{\circ}$ C
RTU5004-03	密度梯度分离试剂	20 ml	4-8 $^{\circ}$ C
CD-50	离心柱套装（包含离心柱和2 ml 连盖收集管）	50 套	RT
YMB-5	塑料研磨棒	5 根/包	RT
	说明书	一份	-

● 使用说明:

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。

需要自备材料:

剪刀; 1.5 离心管; 低温离心机。

一 叶绿体提取:

1.1 材料预处理:

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, 叶片采集后的放置时间也不能超过一天。

1.2 叶片研磨:

1.2.1 取 50-100 mg 新鲜采集植物样品 (叶片, 软茎等), 剪成 1-3 cm² 大小的碎片放入离心柱内。

注: 样品质量尽量控制在 100 mg 以内, 有利于后续充分研磨。

1.2.2 加入 0.1 ml 预冷的提取缓冲液, 用塑料研磨棒向下挤压旋转研磨样品 20-30 次 (大约用时 1-2 分钟), 至样品无可见大块组织碎片, 再补加 0.3 ml 提取缓冲液, 用吸头混匀。

注: 塑料研磨棒可以水洗后重复使用。

1.3 离心去杂质:

盖好 2 ml 收集管管盖, 4℃ 2000 g (约 4600 rpm) 离心 5 分钟。

1.4 粗叶绿体提取:

1.4.1 弃离心柱, 吸头吸弃离心管内上清, 保留沉淀。

注: 如沉淀离心后不实, 可以重悬沉淀后再次离心收集沉淀。

1.4.2 沉淀中加入 0.1 ml 漂洗缓冲液, 轻轻重悬, 溶液即为叶绿体粗提液。

注: 100 mg 叶片提取的粗叶绿体, 溶于 0.1 ml 漂洗缓冲液中, 叶绿体浓度约为 0.6-1 μg Chl/μl (叶绿体浓度测定见步骤 1.6), 可以将多管叶绿体溶液 4℃ 4200 g 离心 5 分钟, 合并叶绿体沉淀, 用漂洗缓冲液将叶绿体浓度调整为 1 μg Chl/μl (1 mg Chl/ml), 分装为 50 μl 每只, -80℃ 贮存。

1.5 精制叶绿体提取:

1.5.1 即用型梯度分离液配制:

在干净的 1.5 ml 离心管中加入 0.4 ml 密度梯度分离试剂和 0.6 ml 漂洗缓冲液, 涡旋彻底混匀。

1.5.2 将步骤 1.4.2 的 0.1 ml 叶绿体粗提液缓慢加入到即用型梯度分离液上方。

1.5.3 4℃ 4200 g (约 6600 rpm) 离心 10 分钟, 小心弃上清, 沉淀为精制叶绿体。

1.5.4 在沉淀中加入 0.5 ml 漂洗缓冲液, 轻柔重悬沉淀。

1.5.5 4℃ 4200 g (约 6600 rpm) 离心 5 分钟, 弃上清, 保留沉淀。

1.5.6 沉淀中加入 0.1 ml 漂洗缓冲液, 轻轻重悬, 溶液即为精制叶绿体。

注：100 mg 叶片提取的精制叶绿体，溶于 0.1 ml 漂洗缓冲液中，叶绿体浓度约为 0.3-0.7 $\mu\text{g Chl}/\mu\text{l}$ （叶绿体浓度测定见步骤 1.6），可以将多管叶绿体溶液 4 $^{\circ}\text{C}$ 4200 g 离心 5 分钟，合并叶绿体沉淀，用漂洗缓冲液将叶绿体浓度调整为 1 $\mu\text{g Chl}/\mu\text{l}$ （1 mg Chl/ml），分装为 50 μl 每只，-80 $^{\circ}\text{C}$ 贮存。

1.6 叶绿素含量测定：

通常叶绿体含量用单位叶绿素（Chl）含量来表示，即 x mg Chl/ml 叶绿体悬浮液。

1.6.1 取 10 μl 叶绿体悬浮液加入到 990 μl 95%乙醇溶液中，混匀。

1.6.2 测定 OD₆₄₉ 和 OD₆₆₅ 吸光值，用 95%乙醇做空白对照。

1.6.3 根据以下公式计算叶绿素：

$$\text{叶绿素浓度 (mg/ml)} = 100 \times (18.16 \times \text{OD}_{649} + 6.63 \times \text{OD}_{665})$$

100：稀释倍数

二. 叶绿体的使用：

2.1 叶绿体功能研究：

如果用于完整叶绿体的功能或酶活性研究，初始 100 mg 样品分离得到的叶绿体样品调整叶绿体浓度为 1 $\mu\text{g Chl}/\mu\text{l}$ ，50 $\mu\text{l}/\text{管}$ 分装，-80 $^{\circ}\text{C}$ 贮存备用。不建议长期贮存，尽快使用。

2.2 叶绿体蛋白电泳：

2.2.1 叶绿体蛋白变性样品处理：

2.2.1.1 取 50 μl 叶绿体溶液（1 $\mu\text{g Chl}/\mu\text{l}$ ）；

2.2.1.2 4 $^{\circ}\text{C}$ 4200g 离心 5 分钟，弃上清，沉淀中加入 SDS-PAGE 上样缓冲液（货号：PL080，PL113，PL121）处理，建议调整上样液浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ；对于多次跨膜蛋白（Multi-pass membrane protein）的变性电泳检测，**样品建议使用 37 $^{\circ}\text{C}$ 处理 30 分钟**，不要 95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 分钟，因为在 95 $^{\circ}\text{C}$ 高温情况下，多次跨膜蛋白极易聚集形成多聚体，样品会聚集，WB 检测会表现为比实际蛋白大小更大的分子量；

2.2.1.3 使用 SDS-PAGE 凝胶（货号：RTD6132，RTD6116）电泳，每个泳道上样 10-40 μl （5-20 μg ）。

2.2.2 叶绿体蛋白 BN 非变性样品处理：

2.2.2.1 取 50 μl 叶绿体溶液（1 $\mu\text{g Chl}/\mu\text{l}$ ）；

2.2.2.2 4 $^{\circ}\text{C}$ 4200g 离心 5 分钟，弃上清，沉淀中加入 50 μl 类囊体膜增溶缓冲液，轻柔重悬沉淀，尽量不产生气泡，冰浴 10 分钟；

2.2.2.3 4 $^{\circ}\text{C}$ 16000 g 10 分钟，取上清至一干净 1.5 ml 离心管中即为增溶后叶绿体蛋白溶液（小心不要吸取沉淀），此时得到的叶绿体蛋白浓度为 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，其中去垢剂 DDM（n-Dodecyl β -D-maltoside, β -DM, n-十二烷基- β -D-麦芽糖苷）终浓度为 2%；

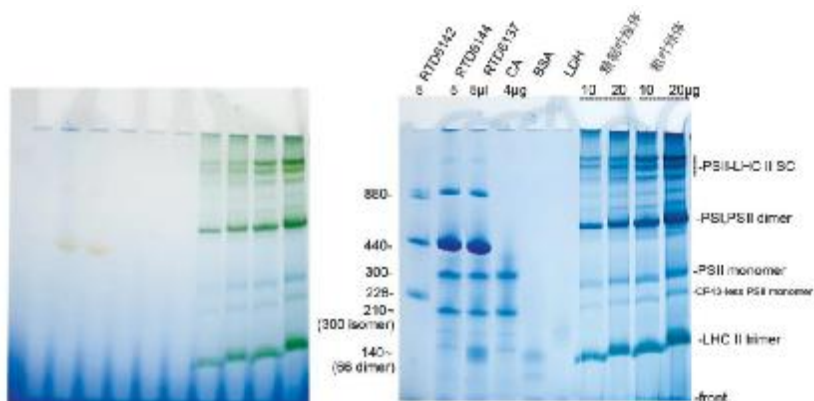
2.2.2.4 叶绿体蛋白溶液中加入 1/10 体积类囊体膜上样缓冲液（10 \times ），使用 BN

凝胶电泳（货号：RTD6139，RTD6140），每个泳道上样 5-20 μg 。

2.2.3 叶绿体蛋白等电聚焦样品处理（2D 凝胶第一维电泳）：

建议叶绿体沉淀中使用溶解液：7 M 尿素，2 M 硫脲，2%CHAPS，20 mM DTT(自备，试剂盒不提供)。

三 实验示例：



程序：取 0.1 克新鲜绿萝叶片加入到离心柱内，加入 0.1 ml 提取缓冲液，研磨 20 次，再加入 0.3 ml 提取缓冲液（平行做 6 管）；4 度 2000g 离心 5 分钟；弃上清，沉淀中加入 0.1ml 漂洗缓冲液，合并 6 管得到 0.6 ml 粗叶绿体，保留 0.2ml 粗叶绿体。取 0.1ml 粗叶绿体加到 1ml 即用型梯度分离液上层（0.4 ml 密度梯度分离试剂加 0.6ml 漂洗缓冲液），平行做 4 管；4 度 4200g 离心 10 分钟，弃上清，沉淀中加入 0.5ml 漂洗液清洗一次，4 度 4200g 离心 5 分钟，4 管精制叶绿体沉淀合并收集于 0.1ml 漂洗液中。用乙醇方法测定叶绿体浓度，调整粗叶绿体和精制叶绿体浓度均为 $1\mu\text{g Chl}/\mu\text{l}$ ；取 $50\mu\text{l}$ 叶绿体溶液，离心，沉淀中加入 $50\mu\text{l}$ 类囊体膜增溶缓冲液，冰浴 10 分钟，4 度 16000g 离心 10 分钟取上清，加入 1/10 体积类囊体膜上样缓冲液（ $10\times$ ），此时叶绿体蛋白浓度为 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，上样 10 μl 和 20 μl 。

电泳：RTD6138-0312 3-12%BN 胶， $1\times$ BN buffer+0.02%G-250，200V 15-3.5mA 50 min 更换 $1\times$ 无色 BN buffer 200V 继续电泳，时间共 103 min，FastBlue 蛋白染色液染色 30 分钟。