



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

植物叶绿体提取试剂盒

Ver.711059

产品编号	产品名称	包装
RTU5001	植物叶绿体提取试剂盒	10 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. 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, ELSIA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。
3. 以每次处理30 g叶片计算, 本产品可使用8-10次提取, 每次能得到3-5 mg左右叶绿体。
4. 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)。

● 贮存及运输:

4-8 $^{\circ}$ C保存, 至少一年有效; 试剂盒常温运输。

● 产品组成:

产品货号	产品名称	包装	贮存
RTU5001-01	叶绿体提取缓冲液 (5 \times)	2 \times 250 ml	4-8 $^{\circ}$ C
RTU5001-02	密度梯度分离试剂	65 ml	4-8 $^{\circ}$ C
RTU5001-03	BSA	3 g	4-8 $^{\circ}$ C
RTU5001-04	1 M DTT (粉末装)	2.5 ml	4-8 $^{\circ}$ C 配制后-20 $^{\circ}$ C贮存
RTU5001-05	过滤纸	50 张/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 $^{\circ}$ C预冷。离心时一定要在4 $^{\circ}$ C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; 50 ml 尖底或圆底离心管; 15 ml 尖底或圆底离心管; 漏斗; 匀浆机; 低温离心机。

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 1×叶绿体提取缓冲液(即用型)配制:

1×叶绿体提取缓冲液(即用型) 配制量 200 ml	
叶绿体提取缓冲液(5×)	40 ml
BSA	0.2 g
1 M DTT	200 μl
灭菌水	定容至 200 ml
冰上预冷待用, 现用现配, 不建议贮存	

注: 一个 30 克样品提取反应需要 150 ml 1×叶绿体提取缓冲液(即用型)。

1.3 叶片匀浆:

1.3.1 新鲜采集植物叶片, 快速去除叶脉(约 30 克)并将叶片剪成 1-3 cm² 大小的碎片并浸泡在 150 ml 的预冷的 1×叶绿体提取缓冲液(即用型)中(每克叶片加 5 ml)。

1.3.2 将浸泡了叶片的溶液转移到匀浆机(货号: RT-2243A)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, 重复 10 秒匀浆 3-4 次至叶片破碎即可, 不要过分匀浆, 否则会降低完整叶绿体的得率。

1.3.3 用 2 层过滤纸置于小漏斗上, 将匀浆液过滤收集到预冷的 250 ml 量筒中, 一般更换三次滤纸可收集约 120 ml 滤液, 将滤液等分到 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)。

1.4 离心去杂质:

4℃ 200 g 离心 5 分钟, 沉淀为未破裂植物组织、细胞或细胞核, 如果样品中淀粉含量较高, 沉淀可能为白色。(右图)

注: 此步骤用低速离心去除杂质, 不能省略, 否则提取的叶绿体会有其他细胞器的污染。



1.5 收集叶绿体粗提液:

1.5.1 将步骤 1.4 得到的上清液平分到 4 个预冷的 50 ml 塑料离心管中。

1.5.2 4℃ 1100 g 离心 15 分钟, 小心弃上清, 沉淀含叶绿体, 呈深绿色(右图)。

1.5.3 在沉淀中加入 1.5 ml 预冷的 1×叶绿体提取缓冲液(即用型), 手弹离心管底部使叶绿体重悬, 收集 4 管溶液(约 6 ml), 此溶液即为叶绿体粗提产物(含有破碎的叶绿体和完整的叶绿体), 可直接用于后续的 SDS-PAGE, Western, 蛋白组分析。



步骤1.5.2 得到的粗提叶绿体

注: 重悬时最好避免溶液起泡, 手指轻弹, 不要用枪头吹打, 否则叶绿体

容易破裂。

1.6 完整叶绿体的纯化：

叶绿体重悬液配制

叶绿体重悬液	
配制量 20 ml	
叶绿体提取缓冲液 (5×)	4 ml
灭菌水	16 ml
冰上预冷待用，现用现配，不建议贮存	

1.6.1 单梯度分离法（适合菠菜，白菜，莴苣，拟南芥，绿萝等）：

1.6.1.1 40%密度梯度液配制-10 ml：

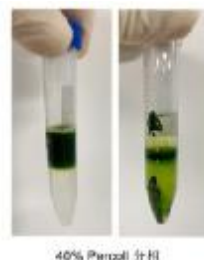
在 15 ml 离心管中加入 6 ml 1×叶绿体提取缓冲液（即用型）和 4 ml 密度梯度分离试剂，充分混合均匀，得 40%密度梯度液，冰浴备用。

1.6.1.2 将 10 ml 40%密度梯度液平分到 2 个 15 ml 离心管中，每管 5 ml；将步骤 1.5.3 得到的叶绿体粗提液 3 ml 小心铺在 5 ml 密度梯度液之上；另一管重复。（5 ml 40%密度梯度液用可以分离 3 ml 叶绿体粗提液，其他体积以此比例换算）。

1.6.1.3 4℃ 3200 g 离心 15 分钟，绿色沉淀为完整叶绿体（右图）。

注：如果最上层的分离试剂不够清亮，可以延长离心 20 分钟。

1.6.1.4 小心弃上清，保留沉淀，每管沉淀中加入 1 ml 叶绿体重悬液，轻柔重悬，可以收集到 2 ml 完整叶绿体溶液。



1.6.2 双梯度分离法（适合烟草，甜菜，豌豆等）：

1.6.2.1 80%密度梯度重液配制-4 ml：

在 15 ml 离心管中加入 0.8 ml 1×叶绿体提取缓冲液（即用型）和 3.2 ml 密度梯度分离试剂，充分混合均匀，得 80%密度梯度重液。

1.6.2.2 40%密度梯度轻液配制-8 ml：

在另一 15 ml 离心管加入 4.8 ml 1×叶绿体提取缓冲液（即用型）和 3.2 ml 密度梯度分离试剂，充分混合均匀，得 40%密度梯度轻液。

1.6.2.3 取一只 15 ml 离心管，加入 1.86 ml 80%密度梯度重液，随后取 3.74 ml 40%密度梯度轻液小心铺在 80%密度梯度重液之上，冰浴备用；然后取步骤 1.5.3 得到的 3 ml 叶绿体粗提液小心铺在密度梯度轻液之上。另一管重复。

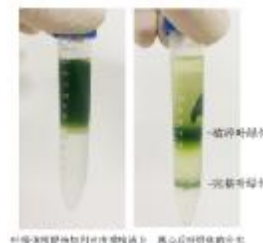
注：每 5.6 ml 40%/80%密度梯度液可以分离 3 ml 叶绿体粗提液；其他体积按照比例调整。

1.6.2.4 4℃ 3200 g 离心 15 分钟，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（右图）。

注：如果最上层的分离试剂不够清亮，可以延长离心 20 分钟。

1.6.2.5 重悬叶绿体：

用广口吸管小心将重液和轻液之间的绿色带（完整叶绿体）转移到新的 15 ml 离心管中，加入三倍体积预冷的叶绿体重悬液，轻柔混匀。



1.6.2.6 离心收集叶绿体:

4°C 1750 g 离心 6 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 叶绿体重悬液, 手指轻弹管底使叶绿体重悬。最终可以收集到 1 ml 完整叶绿体溶液。

1.7 叶绿体贮存:

叶绿体可在显微镜下检查叶绿体完整性。叶绿体重悬液避光-80°C 保存。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。还可用于叶绿体膜, 基质, 类囊体提取以及叶绿体 DNA 和叶绿体 RNA 纯化实验等。

1.8 叶绿素含量测定:

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

1.8.1 取 10 μ l 叶绿体悬浮液加入到 990 μ l 80%丙酮溶液中, 混匀。

1.8.2 3000 g 离心 5 分钟, 取上清测定 OD₆₅₂ 吸光值, 用 80%丙酮做空白对照。

1.8.3 根据以下公式计算叶绿素:

$$\text{叶绿素浓度 (mg/ml)} = (\text{OD}_{652} \times 100) / 36$$

100: 稀释倍数

36: extinction coefficient in ml/cm · mg

1.9 实验示例:

30 克绿萝叶片, 加入 150 ml 1×叶绿体提取缓冲液 (即用型) 匀浆 5×10 秒, 3 次过滤共收集 120 ml 过滤液, 平分 4 管, 4°C 1100 g 离心 15 min, 弃上清, 每管重悬于 1.5 ml 1×叶绿体提取缓冲液 (即用型) 中, 共得到 6 ml 叶绿体粗提液。2×3 ml 粗提液平铺于 2×5 ml 40%密度梯度液之上, 4°C 3200 g 离心 15 分钟, 弃上清, 每管沉淀重悬于 1 ml 叶绿体重悬液中, 共得到 2 ml 精制叶绿体重悬液, 测定叶绿素含量为 3.43 mg/ml 重悬液。30 克叶片提取得到 6.86 mg 叶绿体。取 10 μ l 叶绿体溶液稀释 20 倍, 取 50 μ l 稀释液显微镜 40 倍物镜观察, 如右图。

