天净沙系列

CAT#:221001

常温运输保存

植物叶绿体纯化试剂盒

Plant Chloroplast Isolation Kit

使用手册 V1.0

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

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，专门用于从叶片中纯化完整叶绿体的试剂盒。它具有如下特点:

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，ELSIA 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. 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）。
4. 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。
5. 本产品只可用于科研。

规格及成分

本产品使用大扁盒包装

成分	编号	规格	包装
植物叶绿体纯化匀浆液成分一	221001a	250 mL×2	250 mL 本色瓶
植物叶绿体纯化匀浆液成分二（干粉）	221001b	3 g	10mL 本色瓶
带柄尼龙滤膜	221001c	1 个	塑料袋
Percoll	CAS:65455-52-9	60 mL	60 mL 本色瓶
使用手册	221001sc	1 份	无

运输及保存

常温运输和保存，成分二（干粉）低温保存，有效期一年。

自备物品

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）制备植物叶绿体纯化匀浆液：将自备的去离子水与植物叶绿体纯化匀浆液成分一按 4：1 的比例混合，然后在混合液中加入植物叶绿体纯化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植物叶绿体纯化匀浆液，冰上预冷待用。一次实验（从 30 g 叶片提取叶绿体）所需要的植物叶绿体纯化匀浆液体积跟材料不同而不同。植物叶绿体纯化匀浆液不能长期保存，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 cm^2 大小的碎片并浸泡在适量的预冷的植物叶绿体纯化匀浆液中（每克叶片加 4 mL 植物叶绿体纯化匀浆液，但对烟草和大豆，每克叶片需要加 6 mL 植物叶绿体纯化匀浆液）。
4. 将浸泡了叶片的植物叶绿体纯化匀浆液转移到 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。
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 预冷的植物叶绿体纯化匀浆液，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液，可直接用于后续的 SDS-PAGE，Western，ELSIA 和蛋白组分析。
11. 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。
12. 单密度梯度分离法（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 植物叶绿体纯化匀浆液和 4 mL Percoll，

	充分混合均匀。 b) 在其液面上小心铺上第 10 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℃ 1700×g 离心 6 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 植物叶绿体纯化匀浆液成分一，手指轻弹管底使之重悬。 e) 将叶绿体重悬液转移到 1.5 mL 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。 13. 双密度梯度分离法（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 植物叶绿体纯化匀浆液和 2 mL Percoll，充分混合均匀，得密度梯度重液。 b) 在另一试管中将 3 mL 植物叶绿体纯化匀浆液和 2 mL Percoll 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植物叶绿体纯化匀浆液成分一（非植物叶绿体纯化匀浆液），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 植物叶绿体纯化匀浆液成分一（非植物叶绿体纯化匀浆液），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。 14. 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、叶绿体 RNA 和总蛋白纯化。
关联产品	柱式植物叶绿体 DNA 纯化试剂盒