

CAT#:220948-15

常温运输和保存，
但有 2 个低温成分

BINGENE

植物叶绿体总蛋白纯化试剂盒

Plant Chloroplast Protein Extraction Kit

使用手册 V1.0

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址: www.bingene.com; 电话: 400-6605850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点	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： 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）。 5. 本产品足够 15 次叶绿体总蛋白纯化。																																
规格及成分	本产品使用大纸盒包装 <table><tr><th>成份</th><th>编号</th><th>规格</th><th>包装材料</th></tr><tr><td>植物叶绿体纯化匀浆液成分一</td><td>221001a1</td><td>250 mL×2</td><td>250 mL 本色瓶</td></tr><tr><td>植物叶绿体纯化匀浆液成分二（干粉）</td><td>221001a2</td><td>3 g</td><td>10mL 本色瓶</td></tr><tr><td>带柄尼龙滤膜</td><td>221001b</td><td>1 个</td><td>塑料袋</td></tr><tr><td>Percoll</td><td>65455-52-9</td><td>60 mL</td><td>60 mL 本色瓶</td></tr><tr><td>植物叶绿体蛋白提取溶液 A</td><td>220948a</td><td>15 mL</td><td>15 mL 本色瓶</td></tr><tr><td>植物叶绿体蛋白提取溶液 B</td><td>220948b</td><td>1.5 mL</td><td>1.5mL 本色管</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>220948sc</td><td>1 份</td><td>无</td></tr></table>	成份	编号	规格	包装材料	植物叶绿体纯化匀浆液成分一	221001a1	250 mL×2	250 mL 本色瓶	植物叶绿体纯化匀浆液成分二（干粉）	221001a2	3 g	10mL 本色瓶	带柄尼龙滤膜	221001b	1 个	塑料袋	Percoll	65455-52-9	60 mL	60 mL 本色瓶	植物叶绿体蛋白提取溶液 A	220948a	15 mL	15 mL 本色瓶	植物叶绿体蛋白提取溶液 B	220948b	1.5 mL	1.5mL 本色管	使用手册	220948sc	1 份	无
成份	编号	规格	包装材料																														
植物叶绿体纯化匀浆液成分一	221001a1	250 mL×2	250 mL 本色瓶																														
植物叶绿体纯化匀浆液成分二（干粉）	221001a2	3 g	10mL 本色瓶																														
带柄尼龙滤膜	221001b	1 个	塑料袋																														
Percoll	65455-52-9	60 mL	60 mL 本色瓶																														
植物叶绿体蛋白提取溶液 A	220948a	15 mL	15 mL 本色瓶																														
植物叶绿体蛋白提取溶液 B	220948b	1.5 mL	1.5mL 本色管																														
使用手册	220948sc	1 份	无																														
运输及保存	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。植物叶绿体纯化匀浆液成分二（干粉）需要 4℃保存。																																
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，提取还需要在昏暗的光线条件下进行。 一：叶绿体的纯化 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 0.1g 干粉), 摇晃溶解后所得溶液即为叶绿体制备匀浆液, 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, 可能需要摸索。

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叶绿体制备匀浆液中 (每克叶片加 4 mL 叶绿体制备匀浆液, 但对烟草和大豆, 每克叶片需要加 6 mL 叶绿体制备匀浆液)。
4. 将浸泡了叶片的叶绿体制备匀浆液转移到 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叶绿体制备匀浆液, 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。塑料离心管需要提前称重, 以便最后计算制备所得的叶绿体湿重。
8. 在水平转子离心机上 4℃ 1000 g 离心 7 分钟, 小心弃上清, 沉淀呈浅绿色, 此即为粗提叶绿体。再次称重, 计算出粗提叶绿体湿重。可以直接用于各种后续实验。
9. 如果需要精提叶绿体, 则在粗提叶绿体沉淀中加入 1.5 mL 预冷的叶绿体制备匀浆液, 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, 也不要用力枪头吹打, 否则吹打的拉力容易使叶绿体破裂。沉淀底部有白色淀粉属于正常现象, 但重悬叶绿体时应避免将白色淀粉重悬。将 4 管叶绿体重悬液汇集 (共约 6 mL), 得到叶绿体粗提液, 用密度梯度离心法离心叶绿体粗提液, 将其中的完整叶绿体和其中的其他污染物进一步分离。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。
10. 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℃ 1700g 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(不是植物叶绿体纯化匀浆液),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。

11. 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。

12. 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。

二: 叶绿体总蛋白质的提取

13. 按 15 mg 叶绿体湿重加 1 mL 植物叶绿体蛋白提取溶液 A 和 100 uL 植物叶绿体蛋白提取溶液 B 的比例将这两种溶液加入到粗提叶绿体沉淀(第 8 步)或精提叶绿体沉淀(第 10 步或第 11 步)中,吹打混匀。

14. 冰上放置 30 分钟至 1 小时至溶液变清(叶绿体裂解)。

	15. 4℃ 1,2000 g 离心 1 分钟。 16. 将上清液转移至一新的 1.5 mL 塑料离心管中即得到叶绿体总蛋白溶液,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 上样缓冲液或 2×SDS-PAGE 上样缓冲液使其终浓度为 1×,在沸水中处理 5 分钟后立即上样电泳。
关联产品	植物叶绿体纯化试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒