

## 高纯度叶绿体分离试剂盒(密度梯度法)

产品编号	产品名称	包装
C0565S	高纯度叶绿体分离试剂盒(密度梯度法)	10-50次
C0565M	高纯度叶绿体分离试剂盒(密度梯度法)	50-250次

### 产品简介:

- 碧云天自主研发生产的高纯度叶绿体分离试剂盒(密度梯度法), 英文名High-purity Chloroplast Isolation Kit by Density Gradient Centrifugation, 是一种从新鲜植物叶片中通过研磨、过滤、离心和密度梯度离心在1小时内快速提取完整的有生物活性的高纯度叶绿体的试剂盒。本试剂盒所获得的叶绿体纯度高, 结构高度完整, 可用于光合作用电子链的电子传递和磷酸化、叶绿体蛋白的跨膜转运和组装以及体外叶绿体蛋白合成和定位等生物学功能研究, 也可以作为起始材料用于叶绿体蛋白的提取以及叶绿体DNA和RNA的分离纯化等。
- 叶绿体(Chloroplast)是一些藻类(Algae)和高等植物所特有双层膜结构的、进行光合作用的细胞器, 参与氨基酸合成、叶绿素合成和脂质生物合成等多种生物代谢过程[1]。在高等植物中叶绿体呈透镜状(Lens-shaped), 直径约5-10 $\mu\text{m}$ , 厚约1-3 $\mu\text{m}$ 。在高等植物的叶肉细胞中一般含有约50-200个叶绿体, 占细胞质的约40%。尽管绝大部分叶绿体存在于叶片中, 但它们也在茎、种子和没有成熟的果实中被发现[2, 3]。
- 本试剂盒采用密度梯度离心(Density gradient centrifugation)的方法, 分离并纯化获得高纯度完整的叶绿体。
- **本试剂盒适用范围广。**本试剂盒广泛适用于新鲜的单子叶植物(绿萝、玉米、小麦等)和双子叶植物(拟南芥、烟草、菠菜、大豆、白菜等)等多种类型植物。本试剂盒用于绿萝叶绿体提取的效果请参考图1。

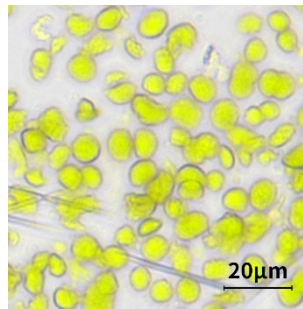


图1. 碧云天高纯度叶绿体分离试剂盒(密度梯度法) (C0565)提取绿萝叶绿体效果图。取0.2g新鲜的绿萝叶片剪碎后加入叶绿体提取缓冲液I, 在冰上用TissueMaster™一次性塑料研磨杵(E6606)进行研磨直至无大块叶片; 将研磨液加入到70 $\mu\text{m}$ 孔径的BeyoGold™细胞过滤器进行过滤, 然后4,200 $\times g$ , 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心5分钟, 弃去上清液, 沉淀含有叶绿体。加入300 $\mu\text{l}$ 叶绿体提取缓冲液II轻轻吹打悬浮沉淀, 得到叶绿体粗提液。将得到的300 $\mu\text{l}$ 叶绿体粗提液小心平铺到500 $\mu\text{l}$ 的40%密度梯度液上, 4,200 $\times g$ , 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心10分钟, 去除上清, 保留沉淀, 加入20 $\mu\text{l}$ 叶绿体提取缓冲液II重悬叶绿体沉淀。取10 $\mu\text{l}$ 叶绿体重悬液置于细胞培养皿中静置10分钟或滴加至载玻片上盖上盖玻片, 光学显微镜下观察叶绿体的数量与形态。实际的叶绿体提取效果可能会因实验条件、检测仪器和条件的不同而存在差异, 图片仅供参考。

- **本试剂盒使用便捷。**本产品不需要特殊的破碎设备, 可以在1小时内快速得到高纯度的完整的有生物活性的叶绿体。
- **本试剂盒提取叶绿体的产量高。**使用本产品每1g叶片能得到约0.1-0.2mg完整的叶绿体。以绿萝为例, 使用本产品每1g绿萝叶片能得到0.2mg左右高纯度的完整的叶绿体。
- 以每次处理0.2g或1g叶片计算, 本试剂盒小包装和中包装分别可进行10-50次和50-250次提取。试剂盒中的过滤器仅足够10和50次提取, 不足部分推荐购买BeyoGold™细胞过滤器(70 $\mu\text{m}$ 孔径, 独立纸塑包装, 无菌) (FSTR070)。

### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
C0565S-1	叶绿体提取缓冲液I	100ml
C0565S-2	叶绿体提取缓冲液II	50ml
C0565S-3	密度梯度分离液	11ml
C0565S-4	BeyoGold™细胞过滤器	10个
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
C0565M-1	叶绿体提取缓冲液I	500ml
C0565M-2	叶绿体提取缓冲液II	250ml
C0565M-3	密度梯度分离液	55ml
C0565M-4	BeyoGold™细胞过滤器	50个
—	说明书	1份

### 保存条件：

4°C保存，6个月有效。叶绿体提取缓冲液I和叶绿体提取缓冲液II -20°C保存，密度梯度分离液4°C保存，BeyoGold™细胞过滤器室温保存，至少一年有效。

### 注意事项：

- 自备丙酮、超纯水或去离子水、剪刀(FS001)、离心管(FTUB030)和TissueMaster™一次性塑料研磨杵(E6606)或玻璃匀浆器、研钵、匀浆机(E1648/E6600)等研磨设备。超纯水推荐选购BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile) (ST876)。
- 叶绿体对温度高度敏感，因此分离叶绿体的所有步骤均需在冰上进行，所用溶液需冰浴处理，离心也需要使用4°C离心机。
- 重悬时，如果使用常规吸头，必须要剪掉枪头顶端，使口径变大，轻柔吹打，避免剧烈吹打导致叶绿体破裂。
- 在实验操作的过程中要避免剧烈震荡或是剧烈吹打，全程保持动作轻柔缓慢，防止叶绿体破裂。
- 提取得到的叶绿体重悬液非常容易失去活性，如果进行活性检测宜尽快使用。
- 冻存的试剂须完全融化并混匀后使用。
- 如果需要更多的细胞过滤器，推荐购买BeyoGold™细胞过滤器(70μm孔径，独立纸塑包装，无菌) (FSTR070)。
- 本试剂盒仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 使用说明：

1. **叶绿体提取缓冲液的准备。**如果是-20°C保存的叶绿体提取缓冲液I和叶绿体提取缓冲液II，解冻后冰浴备用。如果是4°C保存的，取出后冰浴备用。
2. **40%密度梯度液配制。**按照1.5ml的叶绿体提取缓冲液II与1ml密度梯度分离液的比例进行混合，配制适量的40%密度梯度液，冰上预冷。现用现配，不建议贮存。  
注：密度梯度分离液使用前须混匀。
3. **叶绿体的粗提。**
  - a. 采集新鲜植物叶片，先用自来水洗净，再用蒸馏水淋洗，去掉多余水分。将约1g除去叶脉的叶片剪成1-3cm<sup>2</sup>大小的碎片，加入5ml预冷的叶绿体提取缓冲液I，用TissueMaster™一次性塑料研磨杵(E6606)、玻璃匀浆器、匀浆机或研钵在冰上进行研磨。对于常规绿色叶片，当研磨后的液体呈现浓绿色时，吸出液体转移至新的预冷的15ml离心管中，再加入5ml预冷的叶绿体提取缓冲液I继续研磨，直至无大块叶片时将液体吸出，并将合并的共约10ml研磨后的液体用BeyoGold™细胞过滤器进行过滤。对于非常规绿色叶片的情况，可以参考绿色叶片的操作进行。  
注1：在研磨过程中，为了避免叶绿体的破裂，尽量避免气泡产生，操作过程须轻柔。  
注2：推荐每克叶片共使用10ml叶绿体提取缓冲液I。如果叶片的用量有增减，相应的溶液可以按照比例进行调整。  
注3：上述实验过程均须在冰上操作。
  - b. 过滤后的液体4,200×g，4°C离心5分钟，小心弃去上清，沉淀含叶绿体，呈深绿色。加入1.5ml叶绿体提取缓冲液II轻轻吹打悬浮沉淀，得到叶绿体粗提液。可以根据沉淀量适当调整加入叶绿体提取缓冲液II的体积，建议每1克叶片的沉淀加入不超过1.5ml叶绿体提取缓冲液II。吹打悬浮叶绿体沉淀的吸头要剪去尖端，使口径变大，吹打时要缓慢重悬，不能剧烈操作。
4. **叶绿体纯化。**取2.5ml密度梯度液到15ml离心管中，将步骤3b得到的1.5ml叶绿体粗提液小心平铺到2.5ml 40%密度梯度液之上。4,200×g，4°C离心10分钟。去除上清，保留沉淀，每管沉淀中加入200μl叶绿体提取缓冲液II，轻柔重悬。可以根据沉淀量适当调整加入叶绿体提取缓冲液II的体积。  
注1：为了保持较好的分离效果，所吸取的叶绿体粗提液的体积与密度梯度液的体积应该保持在3:5的比例。  
注2：如果最上层的分离溶液不够清亮，可以延长离心时间至20分钟。
5. **叶绿体的使用。**从步骤4纯化获得叶绿体后续可以进行多种用途，包括提取叶绿体蛋白、DNA或RNA，用于叶绿体光合作用活性、电子传递链活性以及各种叶绿体复合体活性的研究等。
  - a. 如果制备叶绿体蛋白样品，推荐使用植物Western及IP细胞裂解液(P0043)或植物RIPA细胞裂解液(强) (P0045)制备叶绿体裂解液。
  - b. 如果制备叶绿体DNA样品，推荐使用基因组DNA小量抽提试剂盒(通用型，离心柱式) (D0063)。
  - c. 如果制备叶绿体RNA样品，推荐使用Beyozol (总RNA抽提试剂) (R0011)或RNAeasy™动物RNA抽提试剂盒(离心柱式) (R0024/R0026/R0027)的说明书。
  - d. 如果进行叶绿体的活性检测，取步骤4获得叶绿体悬浮液进行希尔反应检测，可以判断提取的叶绿体是否具有活性。
  - e. 如果进行叶绿体中叶绿素a/b含量测定。取10μl叶绿体悬浮液到80%丙酮溶液中，进行叶绿素的萃取，测定萃取液在645nm和663nm吸光值，计算叶绿素a/b的含量。
6. **叶绿素总量测定。**通常叶绿体总量用单位重量叶片中叶绿素含量来表示，如mg叶绿素/g叶片。

- 配制80%丙酮：取超纯水、去离子水或双蒸水和丙酮溶液按照超纯水、去离子水或双蒸水:丙酮 = 1:4的比例进行配制。
- 取10 $\mu$ l叶绿体悬液加入到990 $\mu$ l 80%丙酮溶液中，混匀。
- 3,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C离心5分钟，取上清测定OD652吸光值。用10 $\mu$ l的叶绿体提取缓冲液II和990 $\mu$ l 80%丙酮做空白对照。
- 根据以下公式计算叶绿素浓度。随后根据最初的叶片用量和相应的叶绿体悬液的体积，可以计算出单位重量叶片中叶绿素含量。  

$$\text{叶绿素浓度(mg/ml)} = (\text{OD652} \times 100) / 36$$
 100: 稀释倍数  
 36: extinction coefficient in ml/cm  $\cdot$  mg

## 常见问题:

### 1. 叶绿体样品显微镜下拍照困难?

取叶绿体悬浮液滴加至细胞培养皿上，放置显微镜置物台上，观察到目标后，静置数分钟，使得叶绿体沉降至同一水平面后进行拍照。若显微镜观察发现有针状物，可以将叶绿体悬浮液静置放置数分钟，使得针状物沉积，然后取上层叶绿体悬浮液进行稀释、静置和观察。也可以取少量叶绿体滴加到载玻片上，然后盖上盖玻片在显微镜下观察。

## 参考文献:

- Hameed A, Ahmed MZ, Hussain T, Aziz I, Ahmad N, et al. Cells. 2021. 7:10(8).
- Cackett L, Luginbuehl LH, Schreier TB, Lopez-Juez E, Hibberd JM. New Phytol. 2022. 233(5):2000-2016.
- Cocaliadis MF, Fernández-Muñoz R, Pons C, Orzaez D, Granell A. J Exp Bot. 2014. 65(16):4589-98.

## 相关产品:

产品编号	产品名称	包装
C0565S	高纯度叶绿体分离试剂盒(密度梯度法)	10-50次
C0565M	高纯度叶绿体分离试剂盒(密度梯度法)	50-250次
C0566S	叶绿体分离试剂盒(差速离心法)	10-50次
C0566M	叶绿体分离试剂盒(差速离心法)	50-250次
C0362S	植物原生质体分离试剂盒	5ml $\times$ 20次
C0563S	植物原生质体转染试剂盒	100次
C0563M	植物原生质体转染试剂盒	500次
D0045S	植物基因组DNA小量抽提试剂盒(通用型, 离心柱式)	100次
D0045M	植物基因组DNA小量抽提试剂盒(通用型, 离心柱式)	200次
D2489-1 $\mu$ g	pRD29B-luc (植物报告基因质粒)	1 $\mu$ g
D2489-100 $\mu$ g	pRD29B-luc (植物报告基因质粒)	100 $\mu$ g
D2491-1 $\mu$ g	pUBI10-GUS (植物报告基因质粒)	1 $\mu$ g
D2491-100 $\mu$ g	pUBI10-GUS (植物报告基因质粒)	100 $\mu$ g
D2627-1 $\mu$ g	p35SPPDK-EGFP-Flag (植物用绿色荧光蛋白)	1 $\mu$ g
D2627-100 $\mu$ g	p35SPPDK-EGFP-Flag (植物用绿色荧光蛋白)	100 $\mu$ g
E6600	TissueMaster™手持式组织研磨仪	1套
E6606-20pcs	TissueMaster™一次性塑料研磨杵	20支/袋
E6606-100pcs	TissueMaster™一次性塑料研磨杵	100支/袋
FS001	普通剪刀(10cm, 直尖)	1把/袋
FS003	普通剪刀(12.5cm, 直尖)	1把/袋
FS011	普通剪刀(14cm, 直尖)	1把/袋
FSTR040	BeyoGold™细胞过滤器(40 $\mu$ m孔径, 独立纸塑包装, 无菌)	100个/盒
FSTR070	BeyoGold™细胞过滤器(70 $\mu$ m孔径, 独立纸塑包装, 无菌)	100个/盒
FSTR100	BeyoGold™细胞过滤器(100 $\mu$ m孔径, 独立纸塑包装, 无菌)	100个/盒
FTUB515	BeyoGold™ 15毫升锥形离心管	25个/包, 20包/箱
FTUB550	BeyoGold™ 50毫升锥形离心管	25个/包, 20包/箱
P0043-100ml	植物Western及IP细胞裂解液	100ml
P0045-100ml	植物RIPA裂解液(强)	100ml
R0011	Beyozol (总RNA抽提试剂)	100ml
ST876-100ml	BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile)	100ml
ST876-500ml	BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile)	500ml