



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

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

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

植物类囊体膜提取试剂盒

Ver.731075

产品编号	产品名称	包装
RTU5002	植物类囊体膜提取试剂盒	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象双凸或平凸透镜, 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。叶绿体由叶绿体被膜(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。类囊体膜上含有光合色素和电子传递链组分, 光反应在此上进行, 因此类囊体膜也称光合膜。

本公司的植物类囊体膜提取试剂盒采用差速离心方法, 可以从植物中提取到高纯度的类囊体膜样品。

1. 即用型试剂盒, 用户不需要单独配制各种溶液。
2. 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8-10 mg左右类囊体膜样品。
3. 已经成功用于拟南芥, 绿萝, 菠菜, 豌豆, 烟草等植物, 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
RTU5002-01	类囊体膜提取缓冲液 (5 \times)	2 \times 250 ml	4 $^{\circ}$ C
RTU5002-02	类囊体膜漂洗液	100 ml	4 $^{\circ}$ C
RTU5002-03	类囊体膜溶解液	120 ml	4 $^{\circ}$ C
RTU5002-04	类囊体膜增溶缓冲液	5 ml	4-8 $^{\circ}$ C; 配制后-20 $^{\circ}$ C贮存
RTU5002-05	类囊体膜上样缓冲液 (10 \times)	5 ml	-20 $^{\circ}$ C
RTU5002-06	BSA	3 g	4 $^{\circ}$ C
RTU5002-07	过滤纸	50 张	RT
RTU5002-08	过滤漏斗	一个	RT
RTU5002-09	1 M DTT	2.5 ml	4-8 $^{\circ}$ C; 配制后-20 $^{\circ}$ C贮存
	说明书	-	-

● 使用说明:

注意: 类囊体膜对温度高度敏感, 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。如果需要研究类囊体膜的功能，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；匀浆机；低温离心机。

1.1 材料预处理：

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×类囊体膜提取缓冲液（即用型）配制：

	1×类囊体膜提取缓冲液（即用型） 配制量 150 ml
类囊体膜提取缓冲液（5×）	30 ml
BSA	150 mg
1 M DTT	150 μl
灭菌水	定容至 150 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 120 ml 1×类囊体膜提取缓冲液（即用型）。

1.3 叶片匀浆：

1.3.1 新鲜采集植物叶片（约 30 克），快速去除叶脉并将叶片剪成 1-3 cm² 大小的碎片并浸泡在 120 ml 的预冷的 1×类囊体膜提取缓冲液（即用型）中（每克叶片加 4 ml）。

1.3.2 将浸泡了叶片的溶液转移到电动匀浆机（即家用制备果汁的匀浆机，可选货号：RT-2243A）中，低速匀浆 5 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 5 秒。注意：除电动匀浆机外，还可以选择玻璃匀浆器和研磨（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。注：不要用液氮研磨，会损伤类囊体膜；不要过度匀浆，把叶片打碎即可，否则会降低类囊体膜得率。

1.3.3 过滤匀浆液：2 层过滤纸放于漏斗上，用漏斗将滤液收集到预冷的 250 ml 量筒中，一般分三次收集，总共可收集 80-85 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 类囊体膜收集：

4℃ 4200 g 离心 15 分钟，小心弃上清，沉淀即为类囊体膜。

1.5 类囊体膜漂洗：

1.5.1 在类囊体膜沉淀中加入 1 ml 预冷的类囊体膜漂洗液，手弹离心管底部使沉淀重悬；再补加 1 ml 预冷的类囊体膜漂洗液，彻底重悬沉淀。

注：重悬时最好避免溶液起泡，手指轻弹，不要用枪头吹打，否则容易损伤类囊体膜。

1.5.2 4 度 10000 g 离心 2 分钟，弃上清，保留沉淀。

1.6 类囊体膜重悬：

1.6.1 沉淀中加入 1 ml 的类囊体膜溶解液，手弹离心管底部使沉淀重悬；再补加 1 ml 预冷的类囊体膜溶解液，彻底重悬沉淀。

1.6.2 4℃ 10000 g 离心 2 分钟，上清为可溶性蛋白（根据实验需要保留），沉淀为类囊体膜组分。

1.6.3 沉淀中加入 1 ml 类囊体膜溶解液，轻柔重悬沉淀，合并 4 管溶液，即为最终得到的类囊体膜溶液，约 4 ml。

1.7 类囊体膜溶液定量：

通常类囊体膜蛋白含量用单位叶绿素含量来表示，即 $x \mu\text{g}$ 叶绿素/ml 类囊体膜溶液。

1.7.1 取 5 μl 类囊体膜溶液加入到 995 μl 80%丙酮溶液中，混匀。

1.7.2 10000 g 4℃离心 2 分钟，吸取上清，测定 OD₆₆₃ 和 OD₆₄₆ 吸光值，用 80%丙酮做空白对照。

1.7.3 根据以下公式计算叶绿素：

叶绿素浓度 ($\mu\text{g Chl/ml}$) = $200 \times (17.32 \times \text{OD}_{646} + 7.18 \times \text{OD}_{663})$ 注：200 为稀释倍数。

1.8 类囊体膜贮存：

将类囊体膜样品用类囊体膜溶解液稀释到浓度为 1mg Chl/ml，根据需要适量分装，如 50 μl /管，-80℃保存。

1.9 类囊体膜样品溶解和电泳：

类囊体膜增溶缓冲液配制：

将 2.5 ml 增溶缓冲液 (2×) 全部加入到增溶剂粉末中，加入灭菌水定容至 5 ml，彻底混匀，即配成 5 ml 增溶缓冲液，适量分装，-20℃贮存，尽量避免反复冻融。

1.9.1 取 50 μl (浓度为 1 mg Chl/ml) 类囊体膜样品，4℃ 16000 g 离心 5 分钟，弃上清。

1.9.2 沉淀中加入 50 μl 类囊体膜增溶缓冲液重悬样品（此时样品浓度为 1 mg Chl/ml），轻柔混匀，避免产生大量气泡，冰浴 10 min；4℃ 16000 g 离心 15 min；上清为绿色，有微量沉淀。注：如上清为无色，说明增溶不好。

1.9.3 取上清移至新管中(大约可以取到 45 μl 上清)，加入 1/10 体积的类囊体膜上样缓冲液，BN-PAGE 3-12%或 4-16%梯度胶电泳（货号：RTD6139-0312 或 RTD6139-0416），上样体积 5-15 μl 。

1.10 实验示例：

