



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

[http:// www.real-times.com.cn](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.760178-2.0

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×)	2×250 ml	4°C
RTU5002-02	类囊体膜漂洗液	100 ml	4°C
RTU5002-03	类囊体膜溶解液	120 ml	4°C
RTU5002-04	类囊体膜增溶缓冲液	5 ml	4-8°C；配制后-20°C贮存
RTU5002-05	类囊体膜上样缓冲液 (10×)	5 ml	-20°C
RTU5002-06	BSA	3 g	4°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°C；配制后-20°C贮存
	说明书	-	-

### ● 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5~10μm，短径2~4μm，厚2~3μm。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。

- 即用型试剂盒，用户不需要单独配制各种溶液。
- 每次处理30g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。
- 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、效期及运输:

4-8°C保存；一年有效；常温运输。

### ● 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°C预冷。离心时一定要在4°C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 cm<sup>2</sup> 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°C 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，或者用宽口吸头轻柔吹打。

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°C 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  $5 \mu\text{l}$  类囊体膜溶液加入到  $995 \mu\text{l}$  96%乙醇溶液中，混匀。

1.7.2  $10000 \text{ g}$   $4^\circ\text{C}$  离心 2 分钟，吸取上清，测定  $\text{OD}_{665}$  和  $\text{OD}_{649}$  吸光值，用 96%乙醇做空白对照。

1.7.3 根据以下公式计算叶绿素：

叶绿素浓度 ( $\mu\text{g Chl/ml}$ ) =  $200 \times (18.08 \times \text{OD}_{649} + 6.63 \times \text{OD}_{665})$  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  $1 \text{ mg Chl/ml}$ ，根据需要适量分装，如  $50 \mu\text{l}/\text{管}$ ， $-80^\circ\text{C}$  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  $2.5 \text{ ml}$  增溶缓冲液 ( $2 \times$ ) 全部加入到增溶剂粉末中，加入灭菌水定容至  $5 \text{ ml}$ ，彻底混匀，即配成  $5 \text{ ml}$  增溶缓冲液，适量分装， $-20^\circ\text{C}$  贮存，尽量避免反复冻融。

1.9.1 取  $50 \mu\text{l}$ (浓度为  $1 \text{ mg Chl/ml}$ )类囊体膜样品， $4^\circ\text{C}$   $16000 \text{ g}$  离心 5 分钟，弃上清。

1.9.2 沉淀中加入  $50 \mu\text{l}$  类囊体膜增溶缓冲液重悬样品（此时样品浓度为  $1 \text{ mg Chl/ml}$ ），轻柔混匀，避免产生大量气泡，冰浴  $10 \text{ min}$ ； $4^\circ\text{C}$   $16000 \text{ g}$  离心  $15 \text{ min}$ ；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  $45 \mu\text{l}$  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  $5-15 \mu\text{l}$ 。

## 1.10 实验示例：

