

Minute™ 类囊体富集和叶绿体组分分离试剂盒

目录号：CF-055

描述：

叶绿体是质体的一种，由两层膜包围，是光合作用的场所。光合作用的功能是建立在囊状结构薄膜类囊体，以及叶绿体基质中酶的作用的基础上。类囊体膜在结构上与叶绿体膜不同，其形成取决于叶绿体被膜特有的生物合成和运输活动。本试剂盒利用离心管柱技术和差速离心（无需超速离心）可将叶绿体分为类囊体膜、外被和基质三部分。分离的类囊体以天然形式存在，可用于功能研究和蛋白质亚细胞定位研究（使用 Western blotting/质谱等）。试剂盒中的缓冲液不含表面活性剂和 EDTA。操作大约 1 小时内即可完成。

试剂盒组分(20 preps):

1. 缓冲液 A	25ml
2. 缓冲液 B	30ml
3. 离心管柱/2.0ml 收集管	40 套
4. 1.5ml 研磨杵	2 根
5. 蛋白提取粉	5g

所需自备附加材料

台式离心机(在 4-8°C 下进行所有离心步骤)

1.5ml 离心管

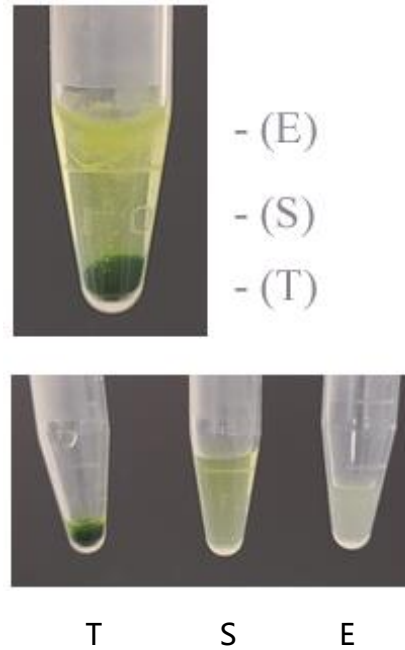
运输和储存： 常温运输，-20 度储存。

操作方法：

注意： 开始操作前请仔细阅读整个说明书。建议在使用前将蛋白酶抑制剂添加到分装的缓冲液 A 和 B 中（请根据蛋白酶抑制剂母液倍数添加，例如母液是 100x，添加时按照 1：100 添加，即 1ml 缓冲液中添加 10ul 抑制剂）。缓冲液需要在室温下解冻，使用前，**翻转倒置缓冲液 A 几次混匀**，

并将缓冲液在冰上预冷。

1. 将 400-500 mg 新鲜幼嫩绿色植物叶片插入 1.5 ml 离心管中，并使用研磨杵的平端将其向下推至底部，然后将其放在离心管架上。加入 100 μ l 缓冲液 A，用 1 ml 移液器吸头尖端反复冲压样品约 250-300 次，使叶绿体从细胞中释放出来。再次加入 400 μ l 缓冲液 A，并使用杵尖端将样品扭转按压研磨约 100 次（研磨杵可重复使用，用水冲洗并用纸巾擦干即可）。将离心管柱放置于 2.0 ml 收集管中，并使用 1 ml 吸头尖端将样品浆液刮入离心管柱中，直到离心管柱装满，丢弃多余的浆液（如有）。
2. 盖上盖子，4 $^{\circ}$ C，2,000 X g 离心 5 分钟。弃掉离心管柱，弃掉收集管中的上清液，在沉淀中加入 500 μ l 缓冲液 A，用移液器上下吹打 20-30 次将绿色沉淀（分离的叶绿体）重悬。将重悬的叶绿体转移到一个新的 1.5 ml 离心管中，4 $^{\circ}$ C，1,500 X g，离心 5 分钟，然后完全去除上清液。
3. 在沉淀中加入 100 μ l 缓冲液 A 中重复吹打将绿色沉淀重悬，然后添加 200 mg 蛋白质提取粉。用研磨杵尖端反复按压扭转 250-300 次研磨叶绿体。不取出研磨杵，向离心管中加入 500 μ l 缓冲液 B，并继续研磨约 50 次。
4. 4 $^{\circ}$ C，600 Xg，离心 5 分钟。将所有上清液转移到一个新的离心管中（记作“**Super-1**”），并放在冰上。按照步骤 3 所述再次研磨沉淀（仅研磨不需要加液体），并将 **Super-1** 转移回离心管中。盖上盖子并倒转几次混匀。
5. 再次 4 $^{\circ}$ C，600 Xg，离心 5 min。将 0.5 ml 上清液转移到一个新的 1.5 ml 离心管中，4 $^{\circ}$ C，12,000 Xg，离心 20 min。离心后可以观察到三个部分：深绿色沉淀（**类囊体**）、顶层浅绿色（**不溶性外被**）和透明绿色中间层（**基质**）。



T=Thylakoid (类囊体) ; S=Stroma (基质) ; E=Envelope Membrane (外被)

6. **基质组分**可用 200 μ l 移液器穿过外被层插入中间层，并小心抽出 150-200 μ l 中间层，不要扰动类囊体沉淀成和外被层。
7. 沿着管壁轻轻吹打，重悬顶部和中间层以分离附在管壁上的不溶性外被，不要搅动沉淀。将重悬液（不溶性外被是混浊的）转移到离心管柱套管中（离心柱插入 2.0 ml 收集管中成为套管），4 $^{\circ}$ C，200 X g，离心 2-3 分钟。**外被**将被保留在离心柱上。丢弃收集管，并使用与下游实验兼容的方法重悬外被组分（方法见下面技术说明）。
8. 将步骤 5 中的类囊体沉淀，加入 0.8 ml 缓冲液 B 吹打重悬，4 $^{\circ}$ C，12,000 Xg，离心 10 分钟。弃掉所有上清液并保存沉淀（**沉淀即是类囊体组分**）。

技术说明：

1. 类囊体和外被部分不溶于水。它们可以溶解在含有表面活性剂的缓冲液中（见下表）。蛋白质浓度可通过 BCA 法测定。

2.有两种方法收集步骤 7 中的外被组分。

方法 A: 向离心管柱中加入 100-150 μ l 含有表面活性剂的缓冲液 (可根据应用选择下表中溶解液), 上下吸液以溶解外被。将离心管柱放在一个新的 1.5 ml 离心管中, 在室温下孵育 5 分钟。

10,000 X g, 离心 10 秒。收集管中即是溶解的外被蛋白。

方法 B: 如果下游实验不兼容表面活性剂, 用 100-150 μ l 无表面活性剂的缓冲液重悬离心管柱中的不溶外被。重悬后, 用移液器转出至一个新的离心管中即可使用。

注: 离心管柱在加入缓冲液时, 需堵住下方的小开口 (用任何物体, 如戴手套的食指), 以防滴漏。

3.三个组分的蛋白质浓度差异显著。大多数蛋白质位于类囊体部分。外被部分只含有少量蛋白质。

推荐按照下游实验应用选购以下蛋白溶解液

产品名称	货号	下游实验应用
Minute™ 变性蛋白溶解液	WA-009	SDS-PAGE 电泳, WB, 胰酶消化, 用生物素标记或组氨酸标记纯化蛋白质等实验
Minute™ 非变性蛋白溶解液	WA-010	ELISA, IP, CO-IP, 酶活性检测等其他应用
Minute™ 质谱专用蛋白溶解液	WA-011	胰酶消化及后续的质谱分析

更多信息和活动请扫描
二维码关注官方公众号

