



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@163.com

植物叶绿体 DNA 提取试剂盒

Ver.720478

产品编号	产品名称	包装
RTU5003	植物叶绿体 DNA 提取试剂盒	50 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为双凸或平凸透镜, 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。叶绿体由叶绿体外被(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。

叶绿体DNA (Chloroplast DNA, cpDNA), 存在于叶绿体内, 高等植物叶绿体的DNA为双链共价闭合环状分子, 其长度随生物种类而不同, 其大小在120 kb到217 kb之间, 相当于噬菌体基因组的大小双链环状, 一个叶绿体含有10~50个cpDNA。

本试剂盒是结合植物叶绿体纯化试剂盒和离心柱式植物DNA提取试剂盒而推出的新产品, 专门用于植物叶绿体DNA的快速提取。

1. 纯度高, 不含污染和抑制剂, 可以直接用于酶切、PCR、real-time PCR、multiplex PCR、RAPD、RFLP、AFLP、Southern Blotting, microsatellite analysis等各种后续分子生物学实验。
2. 以每次处理30 g叶片计算, 本产品可使用8-10次提取植物叶绿体, 每次能得到3-5 mg左右叶绿体。按照每次使用0.2 ml 叶绿体溶液计算, 可以至少提取50次叶绿体DNA的纯化。cpDNA产率一般在1-2 μ g/1 g叶片样品。OD260/280一般在1.8以上。DNA片段长度一般在40-50 kb左右。
3. 已经成功用于菠菜, 大豆, 莴笋, 白菜, 烟草和甜菜等双子叶植物, 也适用于单子叶等其他植物(可能需要优化条件)。

● 贮存及运输:

4-8 $^{\circ}$ C 保存, 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
RTU5003-01	叶绿体提取缓冲液 (5 \times)	2 \times 250 ml	4-8 $^{\circ}$ C
RTU5003-02	密度梯度分离试剂	65 ml	4-8 $^{\circ}$ C
RTU5003-03	BSA	3 g	4-8 $^{\circ}$ C
RTU5003-04	1 M DTT (粉末装)	2.5 ml	4-8 $^{\circ}$ C 配制后-20 $^{\circ}$ C贮存

RTU5003-05	过滤纸	50 张/包	RT
RTU5003-06	叶绿体 DNA 提取缓冲液 AP1	25 ml	RT
RTU5003-07	叶绿体 DNA 提取缓冲液 AP2	10 ml	RT
RTU5003-08	叶绿体 DNA 提取缓冲液 AP3(浓缩液)	15 ml	RT
PW-25ml	漂洗液 PW (浓缩液)	25 ml	RT
RNaseA-0.5ml	RNase A (10 mg/ml)	0.5 ml	-20°C
EB-15ml	洗脱缓冲液 EB	15 ml	RT
CG-50	吸附柱 CG (白色)	50 个/包	RT
CT-50	收集管	50 个/包	RT
	说明书	一份	-

● 使用说明:

一 植物叶绿体提取:

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°C 预冷。叶绿体提取过程中离心时一定要在 4°C 进行, 离心力以 g 而不是 rpm 计算。如果需要研究叶绿体的功能, 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; 漏斗; 匀浆机; 低温离心机。

1.1 材料预处理:

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, 叶片采集后的放置时间也不能超过一天。

1.2 1×叶绿体提取缓冲液 (即用型) 配制:

	1×叶绿体提取缓冲液 (即用型) 配制量 200 ml
叶绿体提取缓冲液 (5×)	40 ml
BSA	0.2 g
1 M DTT	200 μl
灭菌水	定容至 200 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 150 ml 1×叶绿体提取缓冲液 (即用型)。

1.3 叶片匀浆:

1.3.1 新鲜采集植物叶片, 快速去除叶脉 (约 30 克) 并将叶片剪成 1-3 cm² 大小的碎片并浸泡在 150 ml 的预冷的 1×叶绿体提取缓冲液 (即用型) 中 (每克叶片加 5 ml)。

1.3.2 将浸泡了叶片的溶液转移到匀浆机 (货号: RT-2243A) 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, 重复 10 秒匀浆 3-4 次至叶片破碎即可, 不要过分匀浆, 否则会降低完整叶绿体的得率。

1.3.3 用 2 层过滤纸置于小漏斗上, 将匀浆液过滤收集到预冷的 250 ml 量筒中, 一般更换三次

滤纸可收集约 120 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 离心去杂质：

4℃ 200 g 离心 5 分钟，保留上清，沉淀为未破裂植物组织、细胞或细胞核（右图）；如果样品中淀粉含量较高，沉淀可能为白色。

注：此步骤用低速离心去除杂质，不能省略，否则得到的叶绿体 DNA 中会有核基因组的污染。



1.5 收集叶绿体粗提液：

1.5.1 将步骤 1.4 得到的上清液平分到 4 个预冷的 50 ml 塑料离心管中；4℃ 1100 g 离心 15 分钟，小心弃上清，沉淀含叶绿体，呈深绿色（右图）。

1.5.2 在沉淀中加入 1.5 ml 预冷的 1×叶绿体提取缓冲液（即用型），手弹离心管底部使叶绿体重悬，收集 4 管溶液（约 6 ml），此溶液即为叶绿体粗提产物。

1.5.3 如果对叶绿体 DNA 是否含细胞核 DNA 的要求不高，则叶绿体粗提液可以直接用于叶绿体 DNA 纯化（步骤 2.1）。



1.6 完整叶绿体的纯化：

叶绿体重悬液配制

	叶绿体重悬液
	配制量 20 ml
叶绿体提取缓冲液（5×）	4 ml
灭菌水	16 ml
	冰上预冷待用，现用现配，不建议贮存

1.6.1 单梯度分离法（适合菠菜，白菜，莴苣，拟南芥，绿萝等）：

1.6.1.1 40%密度梯度液配制-10 ml：

在 15 ml 离心管中加入 6 ml 1×叶绿体提取缓冲液（即用型）和 4 ml 密度梯度分离试剂，充分混合均匀，得 40%密度梯度液，冰浴备用。

1.6.1.2 将 10 ml 40%密度梯度液平分到 2 个 15 ml 离心管中，每管 5 ml；将步骤 1.5.2 得到的叶绿体粗提液 3 ml 小心铺在 5 ml 密度梯度液之上；另一管重复。

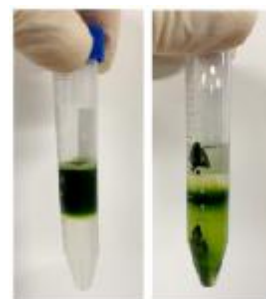
（5 ml 40%密度梯度液用可以分离 3 ml 叶绿体粗提液，其他体积以此比例换算）。

1.6.1.3 4℃ 3200 g 离心 30 分钟，绿色沉淀为完整叶绿体（右图）。

注：如果最上层的分离试剂不够清亮，可以延长离心 20 分钟。

1.6.1.4 小心弃上清，保留沉淀，每管沉淀中加入 1 ml 叶绿体重悬液，轻柔重悬，可以收集到 2 ml 完整叶绿体溶液。

1.6.1.5 此叶绿体溶液可以提取得到无细胞核 DNA 污染的叶绿体 DNA（步骤 2.1）。



1.6.2 双梯度分离法（适合烟草，甜菜，豌豆等）：

1.6.2.1 80%密度梯度重液配制-4 ml：

在 15 ml 离心管中加入 0.8 ml 1×叶绿体提取缓冲液（即用型）和 3.2 ml 密度梯度分离试剂，充分混合均匀，得 80%密度梯度重液。

1.6.2.2 40%密度梯度轻液配制-8 ml:

在另一 15 ml 离心管加入 4.8 ml 1×叶绿体提取缓冲液（即用型）和 3.2 ml 密度梯度分离试剂，充分混合均匀，得 40%密度梯度轻液。

1.6.2.3 取一只 15 ml 离心管，加入 1.86 ml 80%密度梯度重液，随后取 3.74 ml 40%密度梯度轻液小心铺在 80%密度梯度重液之上，冰浴备用；然后取步骤 1.5.2 得到的 3 ml 叶绿体粗提液小心铺在密度梯度轻液之上。另一管重复。

注：每 5.6 ml 40%/80%密度梯度液可以分离 3 ml 叶绿体粗提液；其他体积按照比例调整。

1.6.2.4 4℃ 3200 g 离心 30 分钟，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（右图）。

注：如果最上层的分离试剂不够清亮，可以延长离心 20 分钟。

1.6.2.5 重悬叶绿体:

用广口吸管小心将重液和轻液之间的绿色带（完整叶绿体）转移到新的 15 ml 离心管中，加入三倍体积预冷的叶绿体重悬液，轻柔混匀。

1.6.2.6 离心收集叶绿体:

4℃ 1750 g 离心 6 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 1 ml 叶绿体重悬液，手指轻弹管底使叶绿体重悬。最终可以收集到 2 ml 完整叶绿体溶液。

1.6.2.7 此叶绿体溶液可以提取得到无细胞核 DNA 污染的叶绿体 DNA（步骤 2.1）。

1.7 叶绿体贮存:

叶绿体可在显微镜下检查叶绿体完整性。叶绿体重悬液避光-80℃保存。叶绿体必须尽快使用，否则非常容易失去活性。

1.8 叶绿素含量测定:

通常叶绿体含量用单位叶绿素含量来表示，即 x mg 叶绿素/ml 叶绿体悬浮液。

1.8.1 取 10 μl 叶绿体悬浮液加入到 990 μl 80%丙酮溶液中，混匀。

1.8.2 3000 g 离心 5 分钟，取上清测定 OD₆₅₂ 吸光值，用 80%丙酮做空白对照。

1.8.3 根据以下公式计算叶绿素:

$$\text{叶绿素浓度 (mg/ml)} = (\text{OD}_{652} \times 100) / 36$$

100: 稀释倍数

36: extinction coefficient in ml/cm · mg

二 叶绿体 DNA 提取:

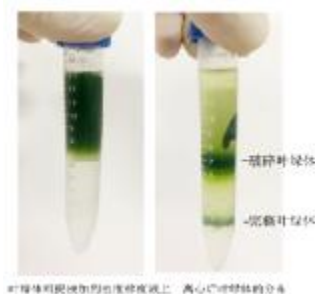
注：以下离心操作可以常温下进行。

2.1 取 0.2-0.4 ml 叶绿体溶液，3500 g 离心 2 分钟，小心弃上清，沉淀为叶绿体。

注：可以根据提取的叶绿体浓度大体估算提取到的 cpDNA 浓度。经验值：每 50 μg 叶绿体（叶绿素浓度）可以提取到 1 μg cpDNA。

2.2 叶绿体沉淀中加入 400 μl 缓冲液 AP1 和 6 μl RNaseA (10mg/ml)，漩涡震荡 1 分钟。

2.3 将离心管放在 65℃ 水浴 10 分钟，水浴过程中颠倒离心管以混合样品数次。



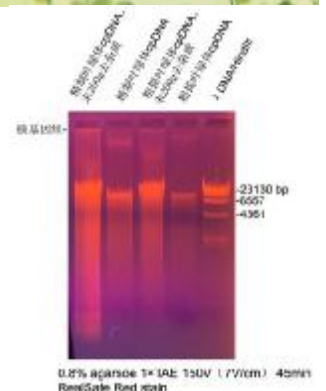
完整叶绿体可被加到密度梯度液上，离心后叶绿体的分布

- 2.4 加入 130 μ l 缓冲液 AP2，颠倒混匀，冰浴 5 分钟。
- 2.5 12,000 rpm 离心 5 分钟，保留上清，上清通常为无色，沉淀为绿色。注：此步骤离心去除去垢剂，蛋白以及多糖等杂质。
- 2.6 将上清（通常可取到 400 μ l）转移到 1.5 ml 离心管中，加入 1.5 倍体积（例如 400 μ l 的上清液加 600 μ l）缓冲液 AP3（使用前请注意是否已经加入无水乙醇），立即颠倒混匀，简短离心以去除管盖内壁的水珠。
- 2.7 吸取步骤 2.6 中的混合液加入到吸附柱 CG 中（吸附柱放入收集管中），12,000 rpm 离心 1 分钟，倒掉废液，吸附柱 CG 放回收集管中。
注：离心吸附柱的最大容积是 700 μ l，如果一次不能完全上柱，可以分次上柱离心，保证全部溶液全部加到离心柱中。
- 2.8 向吸附柱 CG 中加入 700 μ l 漂洗液 PW（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm 离心 1 分钟，倒掉废液，吸附柱 CG 放入收集管中。
- 2.9 向吸附柱 CG 中加入 500 μ l 漂洗液 PW（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm 离心 1 分钟，倒掉废液，吸附柱 CG 放入收集管中。
- 2.10 将吸附柱 CG 放回废液收集管中，12,000 rpm 离心 2 分钟。
注：此步骤非常重要，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR 等）实验。
- 2.11 将吸附柱 CG 转入一个干净的 1.5 ml 离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 50-100 μ l 经 65°C 水浴预热的洗脱缓冲液 EB，室温放置 2 分钟，12,000 rpm g 离心 2 分钟。
注：洗脱缓冲液体积不要少于 50 μ l，体积过小影响回收效率；洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。若用水做洗脱液应保证其 pH 值在 7.0-8.5 范围内，pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率。
- 2.12 叶绿体 DNA 产物-20°C 保存。

三 实验示例：

3.1 叶绿体提取示例：

30 克绿萝叶片，加入 150 ml 1 \times 叶绿体提取缓冲液（即用型）匀浆 5 \times 10 秒，3 次过滤共收集 120 ml 过滤液，平分 4 管，4°C 1100 g 离心 15 min，弃上清，每管重悬于 1.5 ml 1 \times 叶绿体提取缓冲液（即用型）中，共得到 6 ml 叶绿体粗提液。2 \times 3 ml 粗提液平铺于 2 \times 5 ml 40%密度梯度液之上，4°C 3200 g 离心 15 分钟，弃上清，每管沉淀重悬于 1 ml 叶绿体重悬液中，共得到 2 ml 精制叶绿体重悬液，测定叶绿素含量为 3.43 mg/ml 重悬液。30 克叶片提取得到 6.86 mg 叶绿体。取 10 μ l 叶绿体溶液稀释 20 倍，取 50 μ l 稀释液显微镜 40 倍物镜观察，如右图。



3.2 叶绿体 DNA 电泳示例：

叶绿体提取同 3.1。取 100 μ l 叶绿体重悬液，提取 cpDNA，最后用 50 μ l 洗脱，上样 5 μ l，电泳结果见右图左二泳道，cpDNA 大小约 20 kb。