

# 水稻叶片叶绿体蛋白分离及检测

都浩, 马斯琦, 熊立仲\*

作物遗传改良国家重点实验室, 华中农业大学, 武汉

\*通讯作者邮箱: [lizhongx@mail.hzau.edu.cn](mailto:lizhongx@mail.hzau.edu.cn)

引用格式: 都浩, 马斯琦, 熊立仲. (2018). 水稻叶片叶绿体蛋白分离及检测. *Bio-101* e1010123. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010123.

**实验原理:** 水稻叶绿体是水稻光合作用和多种激素合成的场所, 很多核编码蛋白及叶绿体编码蛋白在叶绿体中发挥重要功能。水稻叶绿体蛋白的分离需先用机械研磨叶片, 进行 percoll 密度梯度离心, 以分离出完整未破损叶绿体, 再用细胞裂解液将叶绿体裂解, 分离出叶绿体蛋白。

**实验目的:** 分离叶绿体蛋白, 研究蛋白的定位、功能及质核信号的传导。

**关键词:** 水稻, 叶绿体蛋白, 分离检测

## 材料与试剂

1. 75 目细胞筛
2. 50 ml 圆底离心管
3. 各种型号枪头
4. 水稻叶片
5. 液氮
6. Sorbitol (Biotech, catalog number: S0691)
7. Tricine (Sigma, catalog number: T0377)
8. DTT (Sigma, catalog number: 43815)
9. EDTA (Sigma, catalog number: E6758)
10. MgCl<sub>2</sub> (Sigma, catalog number: M9272)
11. BSA (Roche, catalog number: BP0045)
12. Lysis buffer (pH 7.85)
13. Tricine
14. Glycerol (国药, catalog number: 1001618)

15. PMSF (Sigma, catalog number: P7626)
16. Percoll (GE, catalog number: 17-0891-09)
17. Cysis buffer
18. 5x Sample buffer
19. 2.5x CIB (chloroplasts isolation buffer), pH 7.85 (见溶液配方)
20. Lysis buffer, pH 7.85 (Completely Soluble Mixture of Chloroplast Components)  
(见溶液配方)
21. 40% percoll (见溶液配方)

## 仪器设备

1. 研钵
2. 天平
3. 高速离心机
4. 量筒
5. 水浴锅
6. 电泳仪
7. 移液枪
8. Western blot 装置 (Mini-PROTEAN from Bio-Rad, catalog number: 164-8003)

## 实验步骤

1. 清晨时液氮取样约 3 g，磨样不要磨太碎，加 1x CIB 15 ml。
2. 轻摇几次后立即用 75 目筛子过滤至新的 50 ml 管子。
3. 4 °C 200 x g 洗涤离心 3 min，下面会出现白色沉淀 (淀粉等杂质)，把上清绿色部分移至一新 50 ml 离心管内，1,000 x g 洗涤离心 7 min，收集沉淀部分 (分离叶绿体在绿色沉淀部分，弃上清，因上清中是少量破碎叶绿体)。
4. 用 1 ml 1x CIB 轻轻地把叶绿体打散 (最好用手指轻弹)，移至一新的 2 ml 管内。
5. 在 2 ml 管内配制 1.5 ml 40% percoll (每个样分至 2 个管内)。把步骤 4 的叶绿体悬浮液轻轻摇散，加至 2 ml 管内在上部，此时勿摇动。
6. 4 °C 1,700 x g 离心 6 min 后破碎叶绿体形成一条带在 percoll 的上层，完整的叶绿体在 40% percoll 的底部。

7. 轻轻移出上层 percoll 液体，用 1x CIB (without BSA) 1-2 ml 重悬叶绿体后 4 °C 1,700 x g 离心 3 min (洗去 percoll) 后弃上清，用两倍沉淀体积 Cysis buffer，打散后冰上 30 min，利用离子渗透压的不同使叶绿体裂解开来，加 5x Sample buffer，(每 5 µl 溶解液中加 1 µl 蛋白 Sample buffer)。
8. 100 °C，高温裂解 5 min。12,000 rpm 离心 10 min 后取上清点样。
9. 制 12% PAGE 胶，点样每孔 10 µl，70 V 电泳 20 min，110 V 电泳约 1.5 h 后转膜做 Western blot，操作方法见 Western blot (宗伟等，2018)。

### 注意事项

1. 清晨取样，淀粉含量较少，方便叶绿体分离。
2. 所有步骤应在冰盒上，且弱光进行。
3. 在转移叶绿体时，移液器枪头应剪宽使用。

### 溶液配方

1. 2.5x CIB (chloroplasts isolation buffer), pH 7.85 (200 ml)

1.25 M Sorbitol (Biotech)	45.4 g
125 mM Tricine (Sigma)	4.48 g
2.5 mM DTT (Sigma)	0.077 g
2.5 mM EDTA (Sigma)	0.146 g
2.5 mM MgCl <sub>2</sub> (Sigma)	5 ml (100 mM)
2.5%(w/v) BSA (Roche)	

使用时稀释至 1x CIB。BSA 使用终浓度为 0.1%，可配成 10% BSA 母液，使用时再稀释。(-20 °C 存放)

2. Lysis buffer, pH 7.85 (Completely Soluble Mixture of Chloroplast Components) (100 ml)

10 mM Tricine	0.179 g
2 mM EDTA	0.0584 g
2 mM DTT	100 µl (0.5 M DTT) (用前添加)
10% (v/v) glycerol	10 ml (100% glycerol) (国药)
0.0025% PMSF (Sigma)	用前添加

3. 40% percoll (GE) (100 ml)

40 ml percoll

20 ml ddH<sub>2</sub>O

40 ml 2.5x CIB

### 参考文献

1. 宗伟, 程赛凤, 马斯琦, 熊立仲. (2018). Western Blot. *Bio-101* e1010130. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010130.