

叶绿体的分离、纯化和鉴定



背景与原理

➤ 细胞器分离、纯化在细胞生物学研究中的意义

细胞器的形成是真核细胞生命活动功能区域化的基础，细胞器的分离、纯化是深入研究亚细胞结构与功能的基础。

➤ 细胞器分离、纯化的主要方法和原理

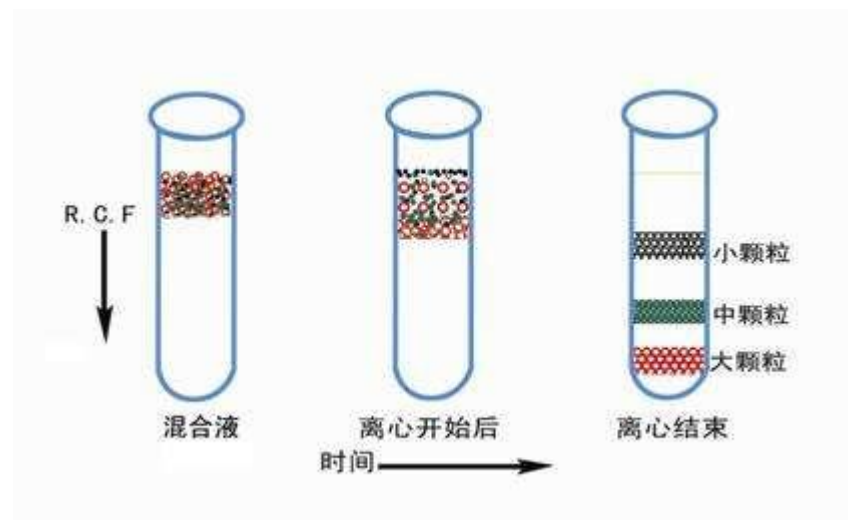
根据细胞器的大小、形状、密度等物理特性差异，离心成为亚细胞组分分离过程中最广泛应用的技术，主要包括差速离心、和密度梯度离心等方法。

➤ 细胞器分离、纯化过程中的主要注意事项

尽可能保持所分离细胞器的生物活性，包括匀浆缓冲液（渗透压、pH、离子强度等）的选择、温度、时间等

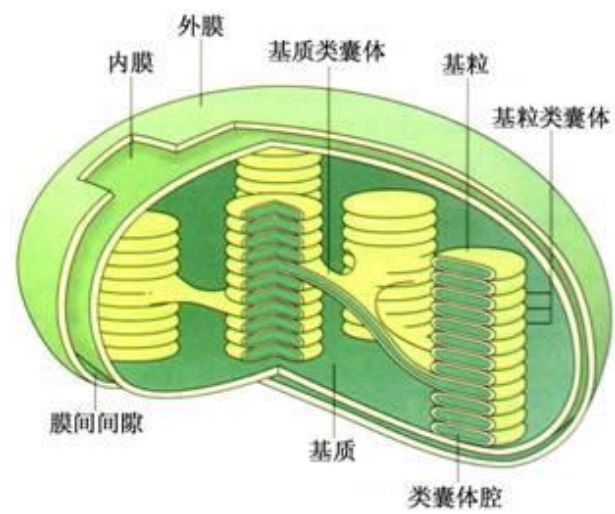
梯度介质的选择

- 1、蔗糖具备足够大的溶解度，以形成所需的密度梯度范围；低温下黏度高，扩散慢。
- 2、蔗糖不会与样品中的组分发生反应。
- 3、蔗糖不会引起样品中组分的凝集、变性或失活，没有毒性。
- 4、蔗糖浓度大时渗透压不大。
- 4、蔗糖PH值中性。
- 5、蔗糖成本低，易获得。

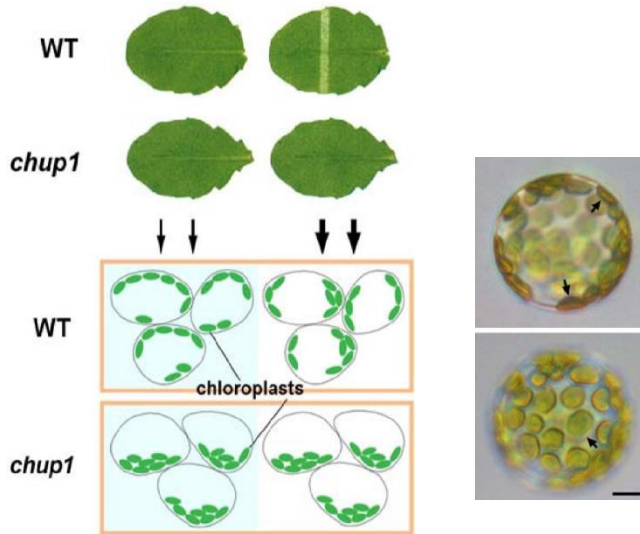


叶绿体

母系遗传 (maternal inheritance)



叶绿体的结构(引自Wolf, 1993)



The Plant Cell, Vol. 15, 2805–2815, December 2003, www.plantcell.org © 2003 American Society of Plant Biologists

CHLOROPLAST UNUSUAL POSITIONING1 Is Essential for Proper Chloroplast Positioning

Kazusato Oikawa,^{a,b} Masahiro Kasahara,^{b,1} Tomohiro Kiyosue,^{b,2} Takatoshi Kagawa,^{b,c,3} Noriyuki Suetsugu,^{a,b} Fumio Takahashi,^{a,b} Takeshi Kanegae,^a Yasuo Niwa,^d Akeo Kadota,^a and Masamitsu Wada^{a,b,4}

^a Department of Biology, Faculty of Science, Graduate School of Tokyo Metropolitan University, Hachioji, Tokyo 192-0397, Japan

^b National Institute for Basic Biology, Okazaki, Aichi 444-8585, Japan

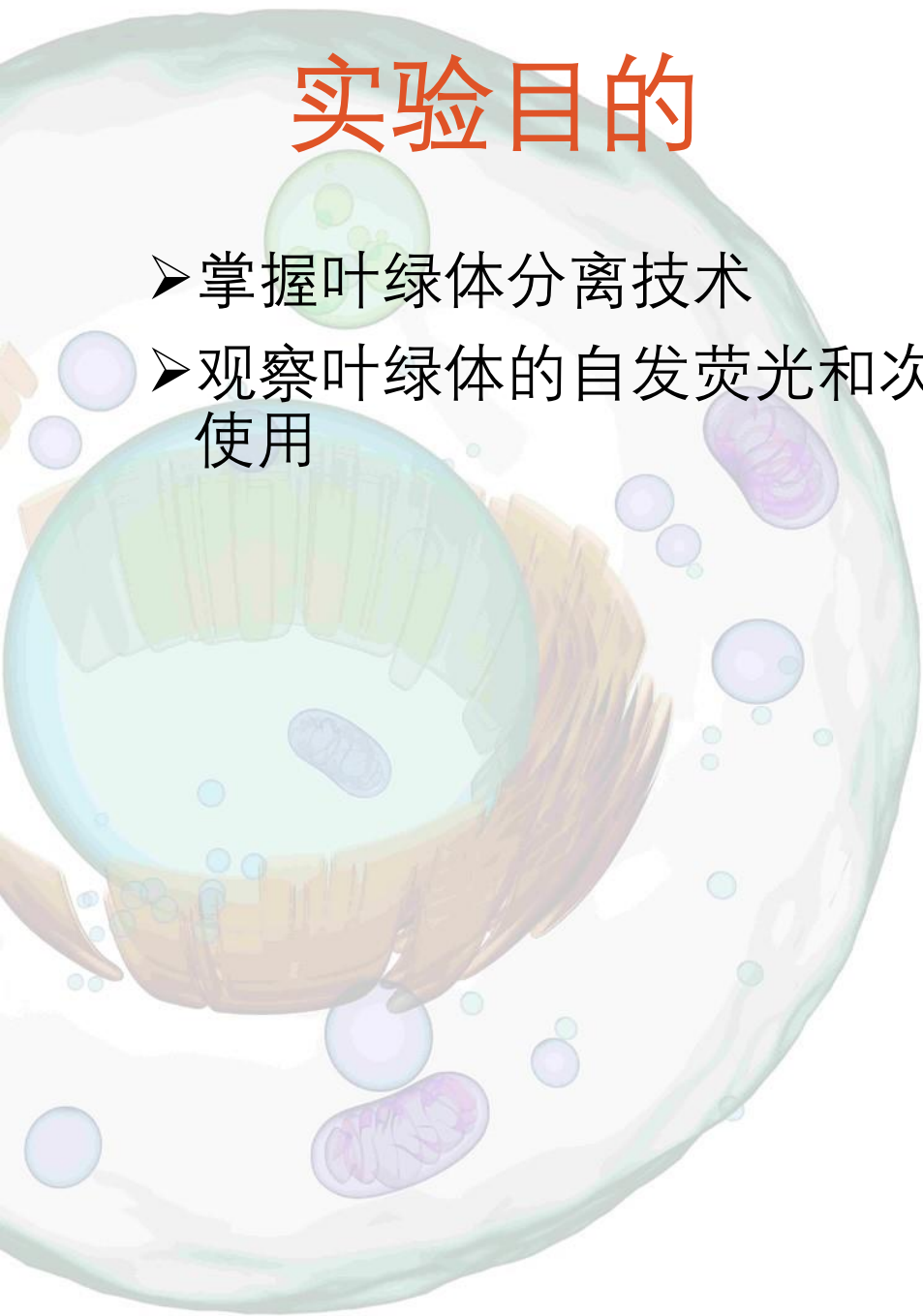
^c Solution Oriented Research for Science and Technology, Japan Science and Technology Corporation, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan

^d Laboratory of Plant Cell Technology, Graduate School of Nutritional and Environmental Sciences, University of Shizuoka, Yada, Shizuoka 422-8526, Japan



实验目的

- 掌握叶绿体分离技术
- 观察叶绿体的自发荧光和次生荧光，熟悉荧光显微镜的使用

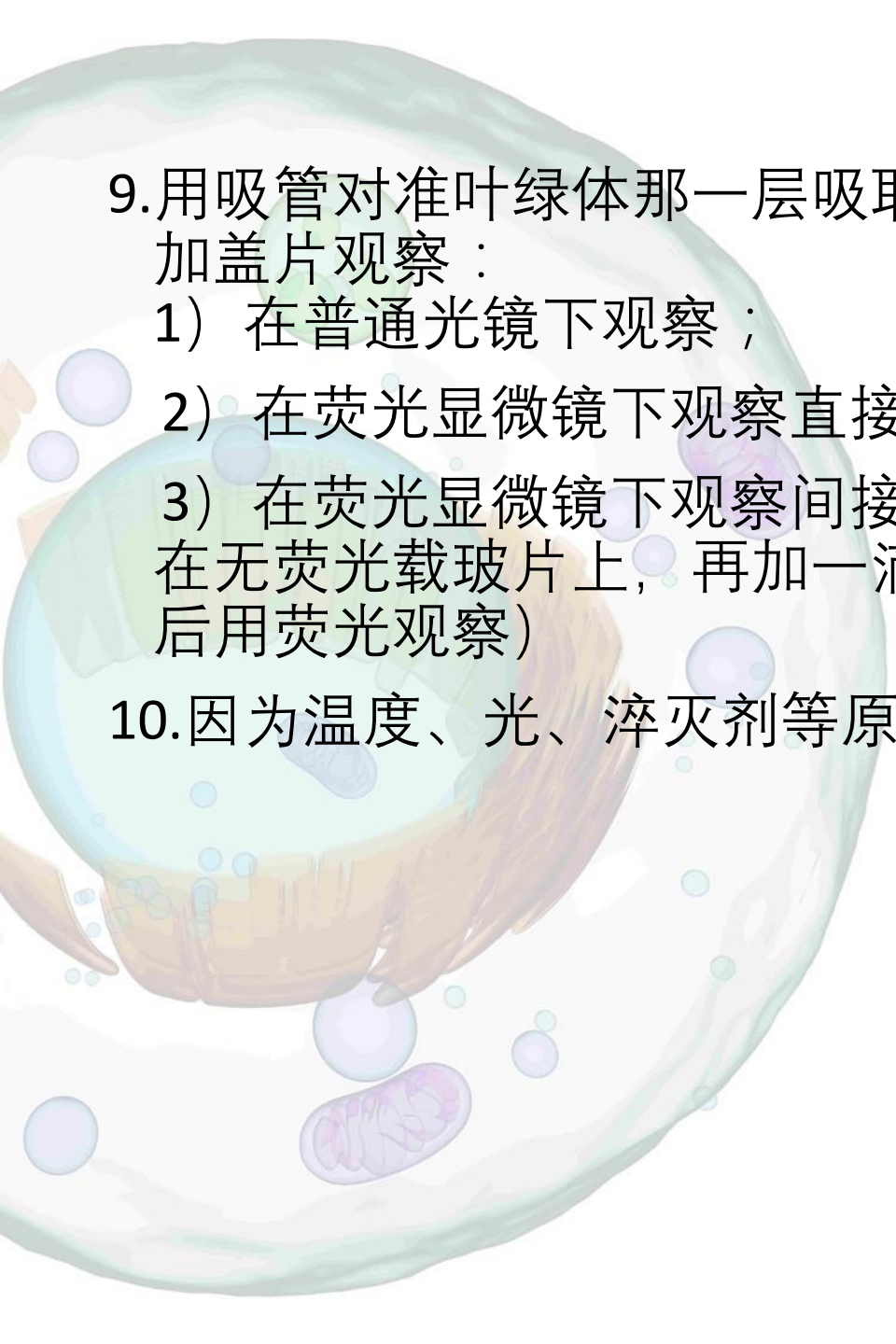


实验材料、仪器和试剂

- 材料：新鲜菠菜
- 仪器：普通光学显微镜、荧光显微镜、普通离心机、研钵、剪刀、玻璃皿等
- 试剂：匀浆介质（0.25mol/L蔗糖，0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液 pH=7.4）
50%蔗糖溶液，15%蔗糖溶液，0.01%吖啶橙

实验步骤

1. 选取菠菜叶片（选择嫩绿色的新鲜叶片），洗净擦干后去除叶梗和粗脉，撕成小碎块（剪碎更宜碾磨），称2~3g放于玻璃匀浆器中
2. 加入预冷（放在冰上预冷）到0°C匀浆介质10ml，在冰上用研钵研磨。
3. 捣碎液用尼龙网过滤于50ml烧杯中。
4. 将滤液平分到2个离心管中（2ml），1000r/min下离心1min(离心机配平)，轻轻吸取上清液。
5. 在2.0ml离心管内依次加入50%蔗糖溶液0.9ml和15%蔗糖溶液0.5ml（注意15%蔗糖溶液要缓缓沿离心管壁注入，不能搅动50%蔗糖液面）。
6. 小心地沿离心管壁加入0.4ml上清液。
7. 离心8000r/min, 20 min。
8. 取出离心管，可见叶绿体在密度梯度液中间形成带。



9.用吸管对准叶绿体那一层吸取一滴叶绿体悬液滴于载片上，
加盖片观察：

1) 在普通光镜下观察；

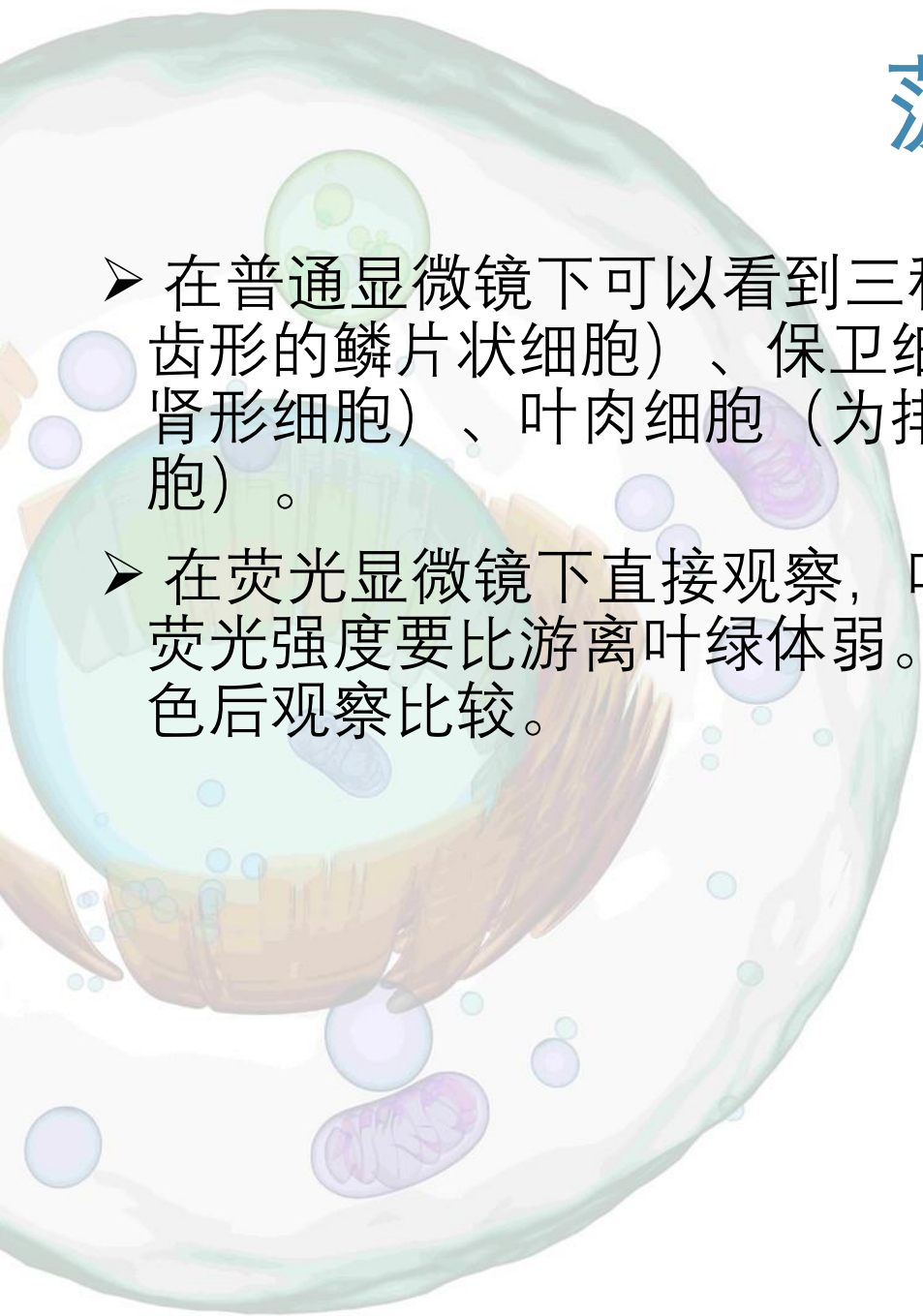
2) 在荧光显微镜下观察直接荧光；

3) 在荧光显微镜下观察间接荧光（取叶绿体悬液一滴滴
在无荧光载玻片上，再加一滴0.01%的吖啶橙，盖上盖玻片
后用荧光观察）

10.因为温度、光、淬灭剂等原因，请尽快拍照。

菠菜叶片切片观察

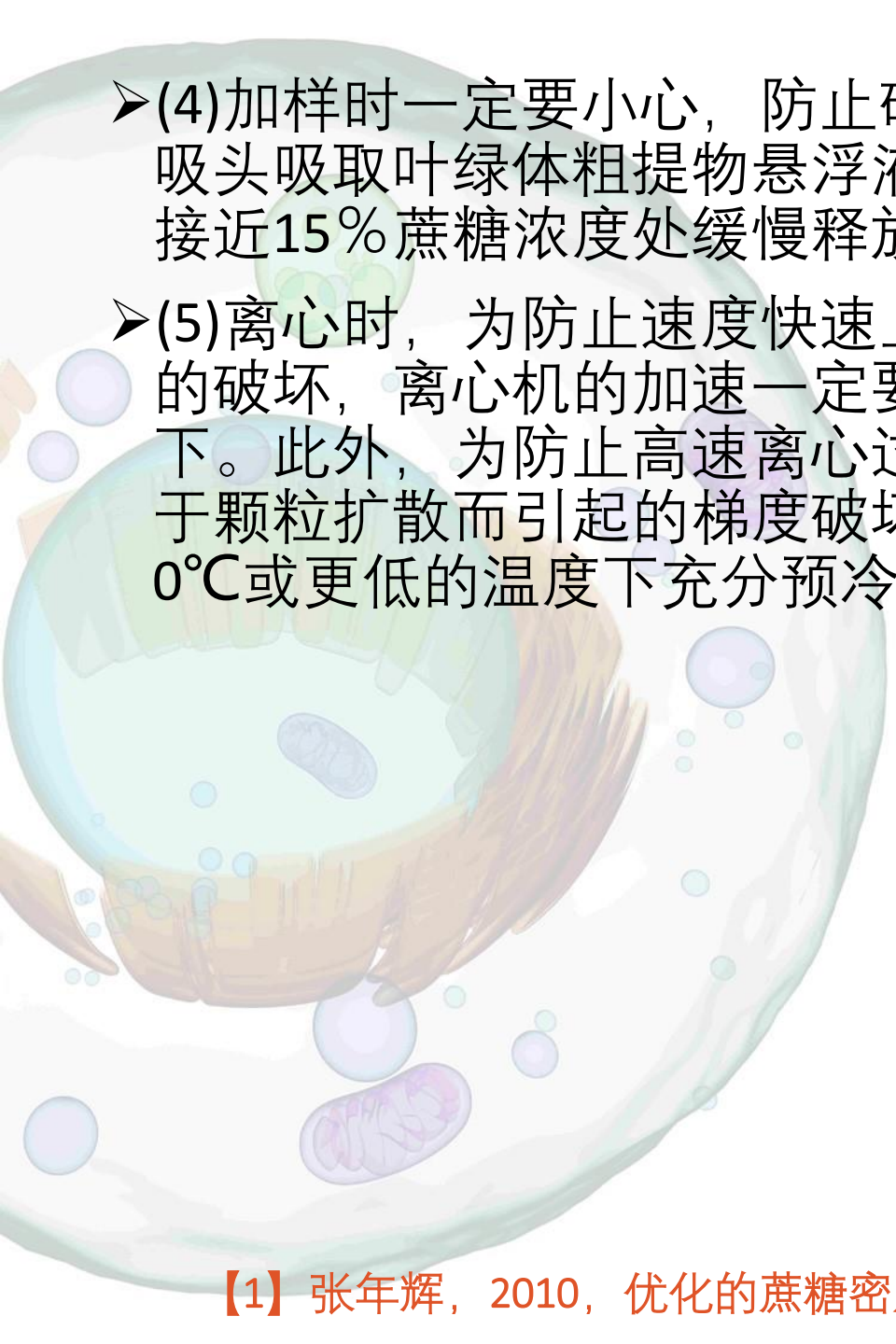
- 在普通显微镜下可以看到三种细胞：表皮细胞（边缘呈锯齿形的鳞片状细胞）、保卫细胞（构成气孔的成对存在的肾形细胞）、叶肉细胞（为排成栅状的长形和椭圆形细胞）。
- 在荧光显微镜下直接观察，叶绿体发出火红色荧光，但其荧光强度要比游离叶绿体弱。气孔发绿色荧光。吖啶橙染色后观察比较。



讨论

优化方法

- (1)为防止光合作用形成的淀粉颗粒在离心时破坏叶绿体，在提取叶绿体前，先将植物材料暗置过夜。
- (2)细胞破碎时，不必过细。用普通的家用食品料理机匀浆2 min同样可以达到很好的效果。此外，过滤时不要用力挤压，以避免对叶绿体被膜的破碎。在用细胞器分离缓冲液悬浮叶绿体粗提物时应轻缓，在冰上轻轻晃动使叶绿体分散开来。

- 
- A detailed illustration of a plant cell, showing a large green chloroplast with internal thylakoid membranes. The cell is surrounded by various organelles and structures, including smaller chloroplasts and cytoplasmic components. The background is a light, textured green, suggesting a cellular environment.
- (4)加样时一定要小心，防止破坏梯度。为此，应采用宽口吸头吸取叶绿体粗提物悬浮液，释放时，将枪头贴于管壁接近15%蔗糖浓度处缓慢释放。
 - (5)离心时，为防止速度快速上升和快速下降对浓度梯度层的破坏，离心机的加速一定要缓慢，而下降时也要缓慢停下。此外，为防止高速离心过程中温度上升可能造成的由于颗粒扩散而引起的梯度破坏，离心前一定要让离心机在0°C或更低的温度下充分预冷^[1]。

[1] 张年辉，2010，优化的蔗糖密度梯度离心法分离完整叶绿体