



叶绿体的分离与荧光观察

实验目的

- ❖ 1.通过植物细胞叶绿体的分离，掌握细胞器分离的一般原理和方法。
- ❖ 2.观察叶绿体的自发荧光和次生荧光，并熟悉荧光显微镜的使用方法。

实验原理

☆ 细胞器分离的过程包括三个主要阶段：破碎细胞和细胞组分的分离、细胞器的鉴定分析

- 1、在等渗溶液中进行组织匀浆、分离
- 2、叶绿体的分离采用差速离心或密度梯度离心法进行
- 3、利用荧光显微镜观察叶绿体的自发荧光和间接荧光（次生/诱发荧光）

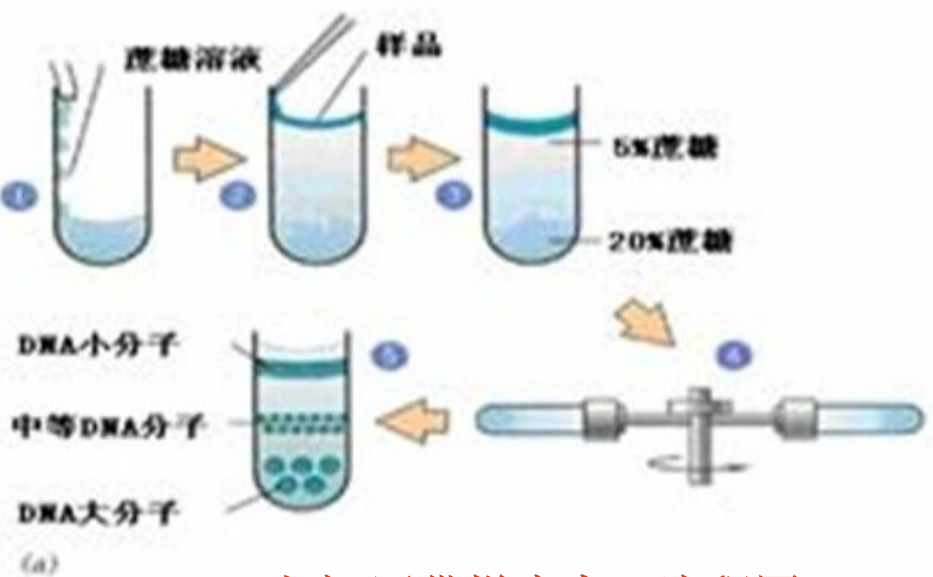
离心分离技术

- ☆ 离心是分离细胞组分和生物大分子最常用的分离方法，因为不同的细胞器和分子有不同的体积和密度，可在不同离心力不同介质沉降分离。
- ☆ 分离各种细胞组分的方法主要有：
 - 差速离心
 - 密度梯度离心

密度梯度离心

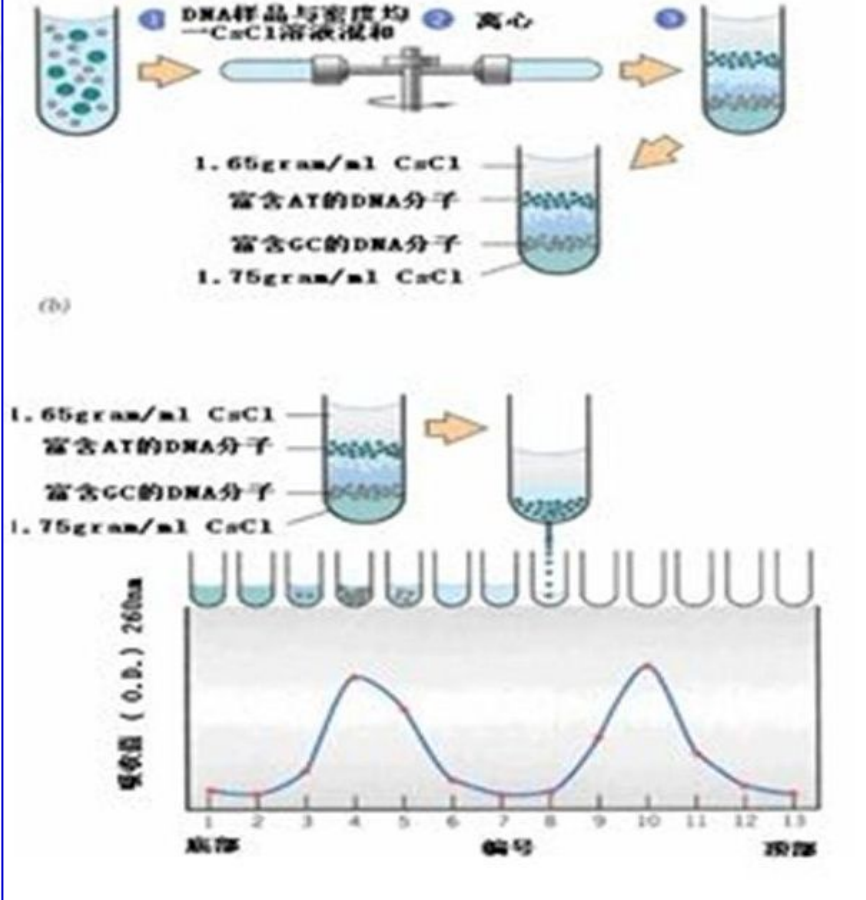
- 用一定的介质在离心管内形成一连续或不连续的密度梯度，将细胞匀浆液混悬或置于介质的顶部，通过重力或离心力场的作用使细胞器分层、分离的方法。
- 这类分离又可分为速率（差速）-区带梯度离心和等密度梯度离心两种。

速率-区带梯度离心和等密度梯度离心



A、速率-区带梯度离心流程图

原理：根据分离的粒子在梯度液中**沉降速度的不同**，通过离心力场的作用，使不同的颗粒在密度梯度层内形成一系列区带，从而达到彼此分离的方法。（分离的颗粒沉降系数相差在**20%以内**）



B、等密度梯度离心流程图

原理：根据不同颗粒在密度梯度介质中存在着**浮力密度差**，在离心力场作用下，颗粒或向下沉降，或向上浮起，一直移动到与它们各自的密度恰好相等的位置上形成区带，从而使不同浮力密度的颗粒得到分离的方法。

两种密度梯度离心方法的异同

特 点	速率-区带梯度离心	等密度离心
分离方法的主要依据	主要依赖分离的粒子在梯度液中沉降速度的不同	依赖于样品颗粒的不同密度来进行离心分离的
介质密度梯度选择	最大密度必须小于样品中粒子的最小密度；梯度平缓	覆盖了待分离物质的密度；梯度陡度较高
离心介质的主要作用	减缓颗粒扩散速度	阻止颗粒移动；筛选与分离颗粒
分辨率范围	沉降系数相差~20%的物质	颗粒密度差异大于1%
离心后区带形成位置	易变(样品易扩散)	不变(样品不扩散)
影响样品区带形成的主要因素	离心时间(过长或过短都不利)	颗粒样品密度(平衡后，离心时间和提高转速都无影响)
一般操作方法	介质梯度应预先形成，离心前将样品小心铺放在密度梯度溶液表面，离心后形成区带。	介质梯度不一定需预先制备，离心时把密度均一的介质液和样品混合后装入离心管，通过离心自形成梯度，让颗粒在梯度中进行再分配。
常用介质	蔗糖、甘油、Ficoll(聚蔗糖)和Percoll	CsCl、硫酸铯、溴化铯、三碘苯衍生物、Ficoll和Percoll等。

密度梯度离心的优点

- ◆ ①分离效果好，可一次获得较纯颗粒；②适应范围广，既能分离具有沉淀系数差的颗粒，又能分离有一定浮力密度的颗粒；③颗粒不会积压变形，能保持颗粒活性，并防止已形成的区带由于对流而引起混合。
- ◆ 缺点：①离心时间较长；②需要特殊的离心介质或制备梯度；③操作严格，不宜掌握。

荧光

☆ 荧光显微镜观察荧光现象：

- 某些物质在一定短波长的光（如紫外光）的照射下吸收光能进入激发态，从激发态回到基态时，就能在极短的时间内放射出比照射光波长更长的光（如可见光），这种光就称为**荧光**。若停止供能，荧光现象立即停止。
- 有些生物体内的物质受激发光照射后，可直接发出荧光,称为**自发荧光**。如叶绿素的火红色荧光。
- 有的生物材料本身不发荧光，但它吸收荧光染料后同样也能发出荧光，称为**间接荧光**。如叶绿体吸附吖啶橙后可发橘红色荧光。

实验步骤

- ☆ 1. 洗净菠菜叶，尽可能使它干燥，去叶柄、主脉后，称取2-3 g，剪碎。
- ☆ 2. 加入预冷到近0℃的匀浆介质（**0.25 mol / L蔗糖，0.05mol / L Tris-HCl缓冲液，pH7.4**）10mL，在组织捣碎器上选高速挡捣碎2 分钟或冰上用研钵研磨。
- ☆ 3. 捣碎液用双层纱布过滤到烧杯中。
- ☆ 4. 将滤液移入2mL离心管，500r / min离心10min，轻轻吸取上清液。
- ☆ 5. 在1.5 mL离心管内依次加入50%蔗糖溶液和15%蔗糖溶液各0.4mL，注意15%蔗糖溶液沿离心管壁缓缓注入，不能搅动50%蔗糖液面。密度梯度制好后可见两种溶液界面处折光有所不同。

实验步骤

- ☆ 6. 小心地沿离心管壁加入0.4mL上清液。
- ☆ 7. 用水平转头离心8 000r / min，20min。
- ☆ 8. 取出离心管，可见叶绿体在密度梯度液中间形成带。
- ☆ 9. 用滴管轻轻吸出1滴叶绿体滴于载玻片上，盖上盖玻片。
- ☆ 10: 观察
 - (1) 第一张不染色，先直接在普通光镜下观察拍照；再在荧光显微镜下观察叶绿体的直接荧光，拍照。
 - (2) 第二张：取叶绿体悬液一滴滴在无荧光载玻片上，再滴加一滴0.01%吖啶橙荧光染料，加盖玻片后在荧光显微镜下观察叶绿体的间接荧光，拍照。

对照实验：菠菜叶徒手切片观察

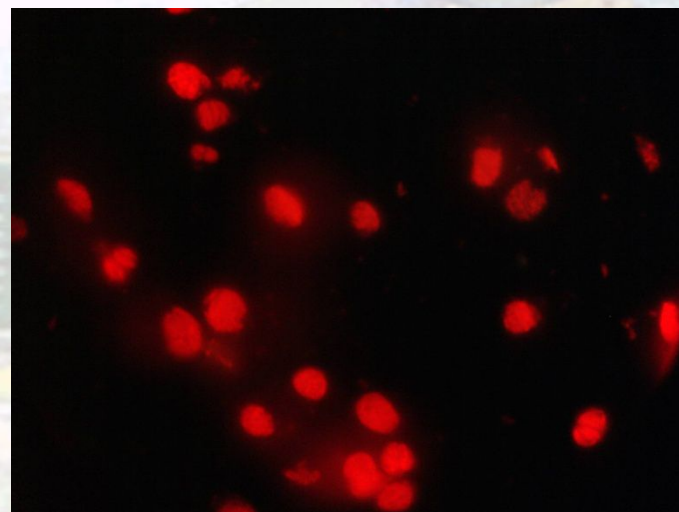
用解剖刀将新鲜的嫩菠菜切削一斜面置于载片上，滴加1—2滴匀浆介质，

(1) 第三张：不染色，直接加盖片后轻压，置普通显微镜下观察。

(2) 第四张：用同样方法制片，但滴加1—2滴0.01%吖啶橙染液染色1min，洗去余液，加盖玻片后即可以荧光显微镜下观察。

实验结果

- ☆ 普通光镜下，可看到叶绿体为绿色橄榄型
- ☆ 荧光显微镜下，选用蓝色激发滤光片，叶绿体自发荧光为火红色，间接荧光为桔红色。细胞核呈黄绿色。



图：叶绿体自发荧光为火红色

实验要求

- 1、两人一组，每组完成四张切片的观察
- 2、前两张切片一共拍照三张（普通显微镜一张、荧光显微镜两张），贴在实验报告上，对照实验不需拍照，文字描述
- 3、荧光染料有毒性，请带手套操作
- 4、荧光显微镜观察和拍照在显微镜室

实验报告

结果：照片，并描述滴片和切片中叶绿体的形态、颜色、数量、纯度

讨论：1、本方法提取叶绿体是否成功？纯度如何？

2、还可采用什么方法提取叶绿体

3、差速离心和密度梯度离心的区别和优缺点。

4、密度梯度离心中：速率-区带离心和等密度梯度离心的区别（**思考**）。