

类胡萝卜素测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-QT056 微板法 96 样 有效期: 12 个月)

一、指标介绍:

叶绿体中所含色素主要有两大类, 叶绿素(包括叶绿素 a 和叶绿素 b)和类胡萝卜素(包括胡萝卜素和叶黄素), 它们与类囊体膜上的蛋白质结合, 成为色素蛋白复合体, 其含量多少及其组成决定了植物对不同光的吸收、利用效率, 常常作为研究光合生理的重要指标。

根据叶绿体色素提取液对可见光谱的吸收, 在 649nm 和 665nm 处测定叶绿素提取物的

吸光值, 在 470nm 处测定类胡萝卜素; 然后利用经验公式计算出样品中叶绿素 a 含量、叶绿素 b 含量、叶绿素总含量及类胡萝卜素含量。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度
试剂一	粉剂×1 瓶	4℃保存
乙醇 (自备)	1000mL×1 瓶	4℃保存

抽提 Buffer 配制: (体积比) 乙醇: 蒸馏水=95:5

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、96 孔板、离心管、酶标仪、锡箔纸、无水乙醇、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取

- (1) 取新鲜植物叶片或其它绿色组织, 去掉中脉。
- (2) 称约 0.1g 剪碎, 用蒸馏水洗干净, 然后加入 1mL 抽提 Buffer, 少量试剂一 (约 50mg), 叶绿素对光敏感, 务必在黑暗或弱光条件下充分研磨 (难磨叶片可以添加少量石英砂助磨), 然后转移至 10mL 玻璃试管。
- (3) 用抽提 Buffer 冲洗研钵, 将所有冲洗液及研钵中所有的绿色物质转入 10mL 玻璃试管, 用抽提 Buffer 补充至 10mL, 玻璃试管置于黑暗条件下或者包上锡箔纸浸提 3h, 观察试管底部组织残渣完全变白则提取完全, 若组织残渣未完全变白, 继续浸提至其完全变白, 最后得到的澄清液体即为待检测的浸提液。

【注】: 若样本自身颜色较浅, 可以降低定容体积, 例如从 10mL 降低至 5mL 或者更低, 真实的总体积 V 代入计算公式进行计算。

2、检测步骤

分别取 200μL 浸提液和 200μL 抽提 Buffer 于 96 孔板, 记为测定管和空白管, 分别于 665nm 和 649nm 和 470nm 处读取吸光值 A, $\Delta A_{665} = (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}})_{665}$, $\Delta A_{649} = (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}})_{649}$, $\Delta A_{470} = (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}})_{470}$ 。

【注】: 若吸光值 A 超过 1, 待检测的浸提液用抽提 buffer 稀释, 计算公式乘以稀释倍数。

五、结果计算:

$$\text{叶绿素 a 含量 (mg/g 鲜重)} = C_a \times \frac{V \times D}{1000 \times W}$$

$$\text{叶绿素 b 含量 (mg/g 鲜重)} = C_b \times \frac{V \times D}{1000 \times W}$$

$$\text{叶绿素总含量 (mg/g 鲜重)} = C_T \times \frac{V \times D}{1000 \times W}$$

$$\text{类胡萝卜素含量 (mg/g 鲜重)} = C_c \times \frac{V \times D}{1000 \times W}$$

$$Ca = 13.95 \times \Delta A_{665} - 6.88 \times \Delta A_{649} \text{ (mg/L);}$$

$$Cb = 24.96 \times \Delta A_{649} - 7.32 \times \Delta A_{665} \text{ (mg/L);}$$

$$C_T = 6.63 \times \Delta A_{665} + 18.08 \times \Delta A_{649} \text{ (mg/L);}$$

$$C_c = (1000 \times \Delta A_{470} - 2.05 \times Ca - 114.8 \times Cb) \div 245 \text{ (mg/L)}$$

$$= (1000 \times \Delta A_{470} - 2851.304 \times \Delta A_{649} + 811.7385 \times \Delta A_{665}) \div 245 \text{ (mg/L);}$$

V---代表提取液体积，10mL；

D---代表稀释倍数，未稀释即为 1；

W---代表样本质量，g。