

叶绿体色素含量测定试剂盒说明书

(微板法 96 样)

一、产品简介：

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：

试剂名称	规格	保存要求
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、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、天平、10mL 玻璃试管、锡箔纸、无水乙醇。

四、叶绿体色素含量的测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备

- (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。

2、上机检测

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：

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

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

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

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

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

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

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

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

$$=(1000 \times \Delta A_{470} - 2851.304 \times \Delta A_{649} + 840.336 \times \Delta A_{665}) \text{ (mg/L)};$$

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