

植物叶绿素含量检测试剂盒说明书

微量法

货号：AC10225

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体×1 瓶（自备）	4℃保存
试剂一	粉剂×1 瓶	4℃保存

溶液的配制：

- 1、提取液：自备无水乙醇和丙酮，将无水乙醇：丙酮（V：V）=1:2 混合待用，提供一个 125mL 空瓶。

产品说明：

植物叶绿素广泛存在于绿色植物组织中，是光合作用的细胞器。其含量与光合作用、营养状况密切相关，是反应植物生长状况的重要指标。

叶绿素a和叶绿素b在645nm和663nm处有最大吸收，根据经验公式可计算得叶绿素a和叶绿素b以及总叶绿素的含量。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96孔板（建议使用非聚苯乙烯材质的96孔板）、可调式移液枪、天平、研钵/匀浆器、锡箔纸、蒸馏水、10mL试管、无水乙醇和丙酮。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 取新鲜植物叶片或其它绿色组织，用蒸馏水洗干净，然后吸干表面水分，去掉中脉，称取约 0.1g，剪碎放入研钵或匀浆器中。
2. 加入 1mL 蒸馏水，少量试剂一（约 10mg），在黑暗或弱光条件下充分研磨，转入 10mL 试管中。
3. 用提取液冲洗研钵，将所有冲洗液转入 10mL 试管中，用提取液定容至 10mL，置于黑暗条件下或者包上锡箔纸浸提 3h，观察底部组织残渣颜色接近于白色则提取完全，若组织残渣未完全变白，继续浸提至组织残渣颜色接近于白色。

二、测定步骤

- 1、分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至645nm和663nm，分光光度计用提取液调零。
- 2、取上层浸提液200μL于微量玻璃比色皿/96孔板中（若使用聚苯乙烯材质的96孔板，请在5min内尽快测定完成），测定663nm和645nm处吸光值，分别记为A₆₆₃和A₆₄₅。

三、叶绿素的计算

$$\text{叶绿素a含量 (mg/g 质量)} = (21.2 \times A_{663} - 4.48 \times A_{645}) \times V_{\text{提}} \times F \div W \div 1000 = 0.01 \times (21.2 \times A_{663} - 4.48 \times A_{645}) \times F \div W$$

$$\text{叶绿素b含量 (mg/g 质量)} = (38.2 \times A_{645} - 7.8 \times A_{663}) \times V_{\text{提}} \times F \div W \div 1000 = 0.01 \times (38.2 \times A_{645} - 7.8 \times A_{663}) \times F \div W$$

叶绿素总含量 (mg/g 质量) = $(33.7 \times A_{645} + 13.4 \times A_{663}) \times V_{\text{提}} \times F \div W \div 1000 = 0.01 \times (33.7 \times A_{645} + 13.4 \times A_{663}) \times F \div W$
V提: 提取液体积, 10mL; F: 稀释倍数; W: 样本质量, g。

注意事项:

- 1、叶绿素对光敏感, 研磨和提取等操作尽量避光或者在弱光下进行。
- 2、一定要浸提至组织残渣完全变白, 否则提取不充分。
- 3、用提取液冲洗研钵一定要冲洗至所有的绿色物质被转移至EP管。
- 4、测定时吸光值超过1, 可进行适当稀释; 当吸光值小于0.05时, 可以适当减少V提取的用量, 注意计算公式中改变V提取数值。
- 5、若使用聚苯乙烯材质的96孔板进行测定, 请在5min内尽快测定完成。

实验实例:

取0.1g吊篮加入1mL蒸馏水, 少量试剂一(约10mg), 在黑暗或弱光条件下充分研磨, 转入10mL试管中。用提取液定容至10mL, 置于黑暗条件下或者包上锡箔纸浸提3h, 之后按照操作步骤, 测得 $A_{663}=0.637$, $A_{645}=0.27$, 计算叶绿素a含量 (mg/g 质量) = $0.01 \times (21.2 \times A_{663} - 4.48 \times A_{645}) \times F \div W = 0.01 \times (21.2 \times 0.637 - 4.48 \times 0.27) \div W = 1.23$ mg/g 质量; 叶绿素b含量 (mg/g 质量) = $0.01 \times (38.2 \times A_{645} - 7.8 \times A_{663}) \times F \div W = 0.01 \times (38.2 \times 0.27 - 7.8 \times 0.637) \div W = 0.53$ mg/g 质量; 叶绿素总含量 (mg/g 质量) = $0.01 \times (33.7 \times A_{645} + 13.4 \times A_{663}) \times F \div W = 0.01 \times (33.7 \times 0.27 + 13.4 \times 0.637) \div W = 1.76$ mg/g 质量。

相关发表文献:

[1] FuYuan Zhu, MoXian Chen, WaiLung Chan, et al. SWATH-MS quantitative proteomic investigation of nitrogen starvation in Arabidopsis reveals new aspects of plant nitrogen stress responses. Journal of Proteomics. September 2018;(IF3.537)