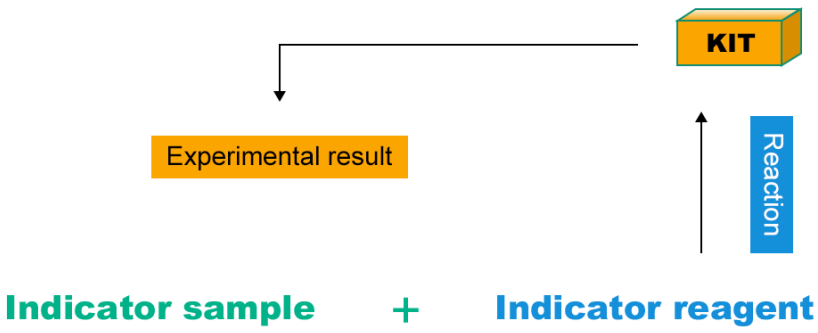
上海茁彩生物科技有限公司

ZCIBIO Technology Co.,Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO：ZC-S0523 Size：100T/96S

植物叶绿素（chlorophyll）检测试剂盒说明书

微量法

***正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定**

一、测定意义：

植物叶绿素广泛存在于绿色植物组织中，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。

二、测定原理：

根据叶绿体色素提取液对可见光谱的吸收，在某一特定波长测定其吸光度，即可用公式计算出提取液中各色素的含量。根据朗伯—比尔定律，某有色溶液的吸光度A与其中溶质浓度C和液层厚度L成正比，即A＝αCL式中：α比例常数。各种有色物质溶液在不同波长下的吸光系数可通过测定已知浓度的纯物质在不同波长下的吸光度而求得。如果溶液中有数种吸光物质，则此混合液在某一波长下的总吸光度等于各组分在相应波长下吸光度的总和。这就是吸光度的加和性。测定叶绿体色素混合提取液中叶绿素a、b和类胡萝卜素的含量，只需测定该提取液在三个特定波长下的吸光度A，并根据叶绿素a、b及类胡萝卜素在该波长下的吸光系数即可求出其浓度。在测定叶绿素a、b时为了排除类胡萝卜素的干扰，所用单色光的波长选择叶绿素在红光区的最大吸收峰。

三、需自备的仪器和用品：

天平、研钵、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、10mL 玻璃试管，锡箔纸。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 1000mL，自备	4℃保存	无水乙醇：丙酮=1:2
试剂一	粉剂×1 瓶	4℃保存	-

五、测定操作：

1. 称取约新鲜植物叶片或其它绿色组织，去掉中脉，称取约 0.1g，剪碎，用蒸馏水洗干净。

2. 加入1mL蒸馏水，少量试剂一（约50mg），在黑暗或弱光条件下充分研磨，转入10mL玻璃试管。

3. 用提取液冲洗研钵，将所有冲洗液转入玻璃试管，用提取液补充至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。

4. 取浸提液200μL于微量石英比色皿/96孔板，提取液调零，测定663nm、645nm和470nm处吸光值，分别记为A_{663}、A_{645} 和A_{470}。

六、计算公式

（1）微量石英比色皿计算方法：

叶绿素a含量（mg/g）=（12.7× A_{663}-2.69×A_{645}）×V提×D÷m÷1000

= 0.01×（12.7×A_{663}-2.69×A_{645}）×D÷m

叶绿素b含量（mg/g）=（22.9×A_{645}-4.68×A_{663}）×V提×D÷m÷1000

= 0.01×（22.9×A_{645}-4.68×A_{663}）×D÷m

叶绿素总含量（mg/g）=（20.21×A_{645}+8.02×A_{663}）×V提×D÷m÷1000

= 0.01×（20.21×A_{645}+8.02×A_{663}）×D÷m

（2）96孔板计算方法：

叶绿素a含量（mg/g）=2×（12.7× A_{663}-2.69×A_{645}）×V提×D÷m÷1000

= 0.02×（12.7×A_{663}-2.69×A_{645}）×D÷m

叶绿素b含量（mg/g）=2×（22.9×A_{645}-4.68×A_{663}）×V提×D÷m÷1000

= 0.02×（22.9×A_{645}-4.68×A_{663}）×D÷m

叶绿素总含量（mg/g）=2×（20.21×A_{645}+8.02×A_{663}）×V提×D÷m÷1000

= 0.02×（20.21×A_{645}+8.02×A_{663}）×D÷m

V提：提取液体积，10mL；D：稀释倍数；m：样本质量，g

七、注意事项：

1. 色素对光敏感，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玻璃试管。
4. 测定时吸光值超过 1，可进行适当稀释。