

植物类胡萝卜素含量测定试剂盒说明书

(货号: G0178W 微板法 96 样)

一、产品简介:

类胡萝卜素 (Carotenoids) 是一类重要的天然色素的总称, 普遍存在于动物、高等植物、真菌、藻类的黄色、橙红色或红色的色素之中, 类胡萝卜素是体内维生素 A 的前体, 同时还具有抗氧化、免疫调节、抗癌、减轻心血管疾病及着色剂等作用。

类胡萝卜素在 440 nm 处具有特殊吸收峰, 样本经溶剂提取后在此波长下可检测其含量。含叶绿体的组织样本, 需排除叶绿素 a 和叶绿素 b 对类胡萝卜素的干扰, 根据经验公式计算出叶绿素 a 和叶绿素 b 的含量, 再进一步得出类胡萝卜素的含量; 不含叶绿素的组织可以直接根据类胡萝卜素的经验消光系数进行计算。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液 A	120mL×1 瓶	4°C保存	有挥发性, 用完后立即盖紧盖子。
提取液 B	60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂×1 瓶	4°C保存	

抽提 Buffer 配制: (体积比) 临用前可按照提取液 A: 提取液 B=2:1 混匀备用。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔 UV 板、天平、锡箔纸。

四、植物类胡萝卜素含量的测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品和实验流程, 避免样本和试剂浪费!

1、样本制备:

- (1) 取新鲜植物叶片或其它绿色组织用蒸馏水洗干净, 吸干表面水分, 去掉中脉。
- (2) 称约 0.1g 组织 (若是含水量低样本或近乎干样, 可适当减少取样质量如 0.02g), 然后加入 1.5mL **抽提 Buffer**, 少量试剂一 (约 20mg), 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), 然后全部转移至 2mL 的 EP 管。

注: a. 提取液即抽提 Buffer 有挥发性, 若研磨后体积变少, 可最后用提取液补足至 1.5mL。

b. 若用研钵进行提取, 建议可分次加入研磨如用 1mL 抽提 Buffer 研磨, 剩余的 0.5mL 来冲洗研钵。

- (3) 置于黑暗条件下或者包上锡箔纸浸提 1h, 观察试管底部组织残渣完全变白则提取完全 (中间可间隔 5-10min 颠倒混合几下, 促进提取完全), 若组织残渣未完全变白, 继续浸提 (如可延长半个小时的浸提时间) 至其完全变白。

【注】1. 若上层浸提液有残渣, 可常温下 8000r/min 离心 5min, 再取上清液检测。

2. 浸提液易挥发, 叶绿素降解等因素均会影响测定结果, 所以提取完成后, 尽快测定可降低干扰。

2、上机检测:

A、黄色或其他非绿色组织 (不含叶绿体) 的类胡萝卜素测定步骤:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 440nm。

② 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称	测定管	空白管 (仅做一次)
澄清浸提液	200	
抽提 Buffer		200
迅速于 440nm 处吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。		

【注】: 1. 若 A 测定值大于 1.5, 可用抽提 Buffer 稀释浸提液再测定, 则稀释倍数 D 带入公式计算。

2. 若 A 测定值小于 0.05, 可减少抽提 Buffer 的量即 V, 或增加取样质量 W, 则改变后的 V

和 W 需带入公式重新计算。

B、新鲜植物叶片或其他绿色组织（含叶绿体）的类胡萝卜素测定步骤：

- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至下面检测所需波长。
- ② 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称	测定管	空白管（仅做一次）
澄清浸提液	200	
抽提 Buffer		200
迅速测定，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】：1.若 A 测定值大于 1，可用抽提 Buffer 稀释浸提液再测定，则稀释倍数 D 带入公式计算。

2.若 A 测定值小于 0.05，可减少抽提 Buffer 的量即 V，或增加取样质量 W，则改变后的 V 和 W 需带入公式重新计算。

五、结果计算：

A、黄色或其他非绿色组织（不含叶绿体）的类胡萝卜素含量计算公式：

$$\text{类胡萝卜素含量}(\mu\text{g/g})=[\Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V1] \div (W \times V1 \div V) \times 1000 \times D = 12 \times \Delta A \div W \times D$$

V---提取液即抽提 Buffer 体积，1.5 mL； W---样本质量，g。

V1---检测时浸提液取样体积，200 μ L=0.2mL=0.2 $\times 10^{-3}$ L；

1000---1mg=1000 μ g； D---稀释倍数，未稀释即为 1；

ε ---公认的类胡萝卜素经验吸收系数，250L/g /cm； d---光径，0.5cm；

B、新鲜植物叶片或其他绿色组织（含叶绿体）的类胡萝卜素含量计算公式：

$$Ca(\text{mg/L})=(13.95 \times \Delta A_{665}-6.88 \times \Delta A_{649}) \div d=27.9 \times \Delta A_{665}-13.76 \times \Delta A_{649};$$

$$Cb(\text{mg/L})=(24.96 \times \Delta A_{649}-7.32 \times \Delta A_{665}) \div d=49.92 \times \Delta A_{649}-14.64 \times \Delta A_{665};$$

$$\begin{aligned} \text{类胡萝卜素浓度: } Cc(\text{mg/L}) &= (1000 \times \Delta A_{470} \div d - 2.05 \times Ca - 114.8 \times Cb) \div 245 \\ &= 8.16 \times \Delta A_{470} - 23.247 \times \Delta A_{649} + 6.618 \times \Delta A_{665}; \end{aligned}$$

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

V---提取液即抽提 Buffer 体积，1.5mL； D---稀释倍数，未稀释即为 1；

d---光径，0.5cm；

W---样本质量，g。