类胡萝卜素(Carotenoid)检测试剂盒(微板法)

产品简介:

叶绿体是光合作用的细胞器，在光合作用研究中，常需要用提取的叶绿体展开下游研究工作，叶绿体中所含的色素主要有两大类，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，其中叶绿素又称叶绿体色素(Chlorophyll)；类胡萝卜素是一种脂溶性且具有营养特性的化合物，给植物和动物提供天然色素，是重要的抗氧化剂，并有能力转换为必需维生素，类胡萝卜素可预防细胞、组织和基因损毁，增强身体免疫系统，抵御感染，减少癌症风险，保护心脏。

类胡萝卜素(Carotenoid)检测试剂盒(微板法)检测原理是类胡萝卜素不溶解于水，而溶于有机溶剂，以有机溶剂粗提类胡萝卜素，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 $A=\alpha CL$，其中α为比例常数，当溶液浓度以百分比浓度为单位，层液厚度为 1cm 时，α为该物质的吸光系数。在本试剂盒情况下叶绿素 a、叶绿素 b、类胡萝卜素分别在 665nm、649nm、470nm 处有最大吸收波，根据经验公式可计算出叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素、类胡萝卜素含量，主要用于植物组织中叶绿素、类胡萝卜素的提取以及以酶标仪定量检测叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素、类胡萝卜素含量。该试剂盒仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

编号 / 名称	GCTP1057 100T	Storage
试剂(A): Carotenoid Assay Buffer	2×530ml	RT
试剂(B): 提取粉剂	6g	RT
使用说明书	1 份	

自备材料:

1、 研钵或匀浆器、离心管、滤纸或纱布、离心机、96 孔板、酶标仪

操作步骤(仅供参考):

1、 类胡萝卜素提取:

①取菠菜或其他植物新鲜叶片，洗净，擦干，去中脉，称取剪碎的新鲜样品 0.1g，置于研钵或匀浆器，加入少量提取粉剂(约 50mg)和 1ml Carotenoid Assay Buffer，研磨或匀浆成液态。

②将研磨液或匀浆液转移至 10ml 离心管，用少量 Carotenoid Assay Buffer 冲洗研钵

或匀浆器数次，最后连残渣一同倒入 10ml 离心管，补加 Carotenoid Assay Buffer 至 10ml，混匀，避光放置 5min～2h。注：也可将组织剪碎，加入 Carotenoid Assay Buffer，避光放置 12~36h，期间晃动数次，使组织与提取试剂充分接触，当组织接近白色，即表示色素提取完成，如果仍有较多组织颜色，应继续浸提至组织残渣颜色接近于白色。

2、滤纸或三层纱布过滤，留取滤液，也可采用 4000r/min 离心 5min，取上清液待测。

3、Carotenoid 测定：

①新鲜植物叶片或其他绿色植物组织(含叶绿体)类胡萝卜素含量测定：

酶标仪开机预热 30min 以上，调节多波长至 665nm、649nm 和 470nm；取类胡萝卜素提取液 200μl 加入 96 孔板中，以 Carotenoid Assay Buffer 调零，分别用酶标仪测定提取液在 665nm、649nm、470nm 处的吸光度(A_{665}、A_{649}、A_{470})。

②黄色或其他非绿色植物组织(不含叶绿体)类胡萝卜素含量测定：

酶标仪开机预热 30min 以上，调节波长至 440nm；取类胡萝卜素提取液 200μl 加入 96 孔板中，以 Carotenoid Assay Buffer 调零，用酶标仪测定提取液在 440nm 处吸光度(A_{440})。

计算：

1、新鲜植物叶片或其他绿色植物组织(含叶绿体)类胡萝卜素含量计算：

叶绿素 a 含量(mg/g)=C_a×V×N/(W×1000)

叶绿素 b 含量(mg/g)=C_b×V×N/(W×1000)

总叶绿素含量(mg/g)=C_T×V×N/(W×1000)

类胡萝卜素含量(mg/g)=C_C×V×N/(W×1000)

式中：$C_a=(13.95\times A_{665}-6.88\times A_{649})/0.6=23.25\times A_{665}-11.467\times A_{649}$ (mg/L)

$C_b=(24.96\times A_{649}-7.32\times A_{665})/0.6=41.6\times A_{649}-12.2\times A_{665}$ (mg/L)

$C_T=(6.63\times A_{665}+18.08\times A_{649})/0.6=11.05\times A_{665}+30.133\times A_{649}$ (mg/L)

$C_C=(1000\times A_{470}/0.6-2.05\times C_a-114.8\times C_b)/245$(mg/L)

$=(1000\times A_{470}-2851.304\times A_{649}+811.7385\times A_{665})/147$(mg/L)

$=6.8\times A_{470}-19.397\times A_{649}+5.522\times A_{665}$ (mg/L)

V=类胡萝卜素提取液体积(ml)=10(ml)

N=稀释倍数

W=样品鲜重或干重(g)

1000=ml 与 L 的单位换算

0.6=200μl 提取液在酶标板中的光径(cm)

2、黄色或其他非绿色植物组织(不含叶绿体)类胡萝卜素含量计算：

类胡萝卜素含量(mg/g)= $A_{440}/(250\times0.6)\times V\times N\times1000/W=0.067\times A_{440}\times N/W$

式中：V=类胡萝卜素提取液体积=0.01(L)

N=稀释倍数

W=样品鲜重或干重(g)

250=类胡萝卜素经验消光系数(L/g/cm)

1000=g 与 mg 的单位换算

0.6=200μl 提取液在酶标板中的光径(cm)

注意事项：

1、 为避免叶绿素和类胡萝卜见光分解，操作时应尽量避光，研磨或匀浆时应尽量缩短时间。

2、 若不确定组织中有无叶绿素影响，可取提取液用分光光度计在波长 600-700nnm 下进行波长扫描，若有波峰，则证明样品中有叶绿素，反之则无。

3、 当样品吸光值大于 1 时，可适当稀释后再进行测定，计算时乘以稀释倍数。

4、 Carotenoid Assay Buffer 易挥发，不用时需拧紧瓶盖。

5、 色素提取液不能出现浑浊现象，否则应重新过滤。

6、 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

7、 试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。

有效期：12 个月有效。

相关产品：

产品编号	产品名称
GCDM0007	瑞氏-姬姆萨复合染色液
GCDP0013	GUS 染色液(即用型)
GCDZ0040	改良苯酚品红染色液
GCTC2033	维生素 C 检测试剂盒(磷钼酸比色法)
GCTC2161	脯氨酸(PRO)检测试剂盒(茚三酮微板法)
GCTE0720	总超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(NBT 核黄素微板法)

附录：我公司用新鲜的绿萝叶片做样品试验：取 0.3g 去除中脉，加入 2ml 试剂 A 和 50mg 试剂 B，用玻璃匀浆器充分匀浆，静置 30s~1min，上层匀浆液倒入干净的 50ml 离心管中，再次加入 2ml 试剂 A，充分匀浆，反复三次，至匀浆器底部组织残渣接近白色，即提取完成。冲洗匀浆器，合并入离心管中，取滤纸放入玻璃漏斗，用试剂 A 湿润滤纸，倒入匀浆液，用干净的 50ml 离心管接收滤液，并用试剂 A 冲洗滤纸上的色素，尽可能避免色素残留，减少实验误差，过滤终止后补加试剂 A 至总体积 50ml；另取 0.3g 作为对照，不研磨，直接浸提，2h 后用试剂 A 调零，用分光光度计检测吸光度值，结果见下表：

ml	试剂 A	研磨提取液	浸提提取液	665nm	649nm	470nm	N
调零管	2			0	0	0	-
A/2	1	1		0.353	0.165	0.587	2
A		2		0.718	0.338	1.184	1
B/2	1		1	0.111	0.052	0.179	2
B			2	0.220	0.103	0.355	1

计算结果如下：

单位	mg/L				mg/g			
	Ca	Cb	Ct	Cc	叶绿素 a	叶绿素 b	总叶绿素	类胡萝卜素
A/2	3.789	1.534	5.324	1.645	1.263	0.511	1.775	0.548
A	7.691	3.181	10.871	3.278	1.282	0.530	1.812	0.546
B/2	1.191	0.485	1.676	0.493	0.397	0.162	0.559	0.164
B	2.360	0.960	3.321	0.979	0.393	0.160	0.553	0.163

