

Implen 社 NanoPhotometer アプリケーションノート

クロロフィル *a*, *b* の定量

【要約】

Implen 社 NanoPhotometer NP80-TOUCH のキュベットモードと微量モードを使用して、クロロフィル *a* (Chl *a*) およびクロロフィル *b* (Chl *b*) の濃度を測定しました。吸光度については、同じサンプルにおける測定ごとのばらつきを確認しました。また算出したクロロフィル *a* (Chl *a*) およびクロロフィル *b* (Chl *b*) の濃度について、試料量との間の直線性を確認しました。

【使用機器】

Implen 社 NanoPhotometer NP80-TOUCH シリアルナンバー : T81430



【材料と方法】

100% メタノール 10 mL に、一般的な方法で調整した濃度未知のシロイヌナズナ葉緑体懸濁液 200・100・50・25 μ L を添加し、色素を抽出しました。遠心後、上清の吸光度を NP80-TOUCH にて、キュベットモードと微量モードで測定しました。キュベットモードでは 3 mL、微量モードでは 3 μ L の試料溶液を測定に使用しました。NP80-TOUCH の設定は表 1 に示しました。キュベットモードと微量モードで、測定は各試料溶液で 3 回繰り返して行いました。

表 1 : NP80-TOUCH の設定 (キュベットモード、微量モード)

メソッド :	波長	メソッド :	波長
モード :	キュベット	モード :	微量
光路長 :	10mm	希釈 :	15 (光路長 0.67mm での測定)
波長 1 :	665nm	波長 1 :	665nm
波長 2 :	650nm	波長 2 :	650nm
波長 3 :	750nm	波長 3 :	750nm
ベースライン補正 :	オフ	ベースライン補正 :	オフ
スムージング :	1	スムージング :	1
希釈倍率 :	1	希釈倍率 :	1

クロロフィル *a* およびクロロフィル *b* の算出には下記の式を用いました。なお、750nm の吸光度をバックグラウンドとし、650nm および 665nm の吸光度から 750nm の吸光度を引いて算出しました。

$$\begin{aligned} 1) \text{ Chl } a &= 16.5 \times (A_{665} - A_{750}) - 8.3 \times (A_{650} - A_{750}) \\ \text{ Chl } b &= 33.8 \times (A_{650} - A_{750}) - 12.5 \times (A_{665} - A_{750}) \\ \text{ Chl } a+b &= 4 \times (A_{665} - A_{750}) + 25.5 \times (A_{650} - A_{750}) \end{aligned}$$

【測定結果】

100% メタノール 10 mL に、シロイヌナズナの葉緑体懸濁液 200・100・50・25 μL を添加して抽出した試料溶液のクロロフィル濃度を算出するため、NP80-TOUCH（シリアルナンバー：T81430）を使用して吸光度を測定しました。キュベットモード、微量モードで測定をしました。

得られたスペクトルを図 1 に示しました。

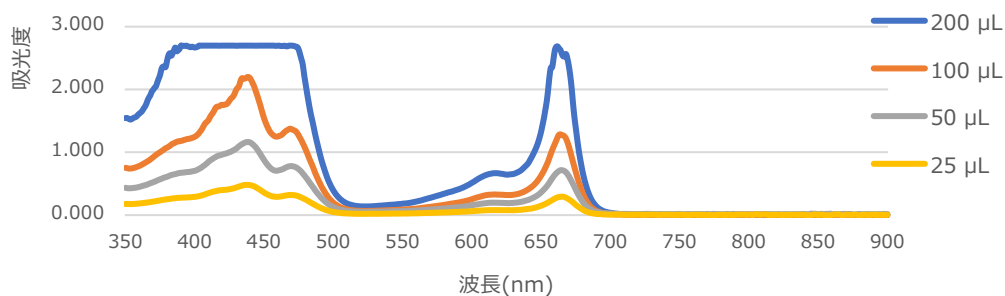


図 1-1. キュベットモードで測定した時のスペクトル

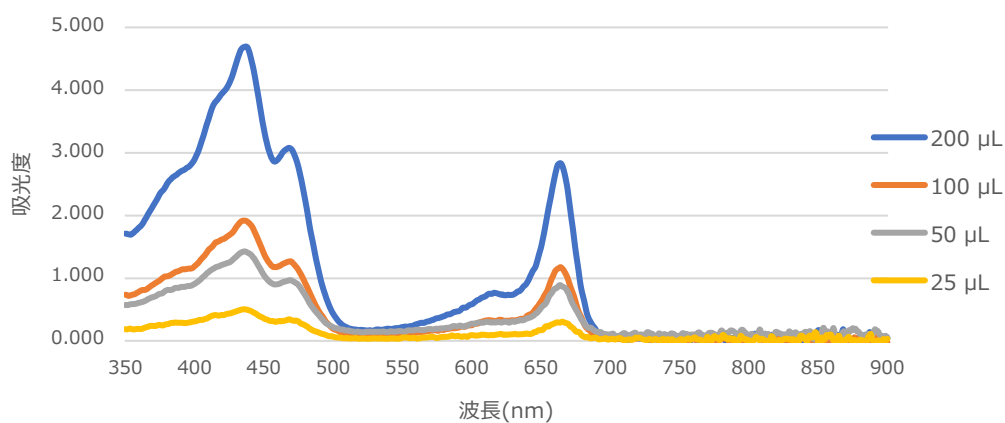


図 1-2. 微量モードで測定した時のスペクトル

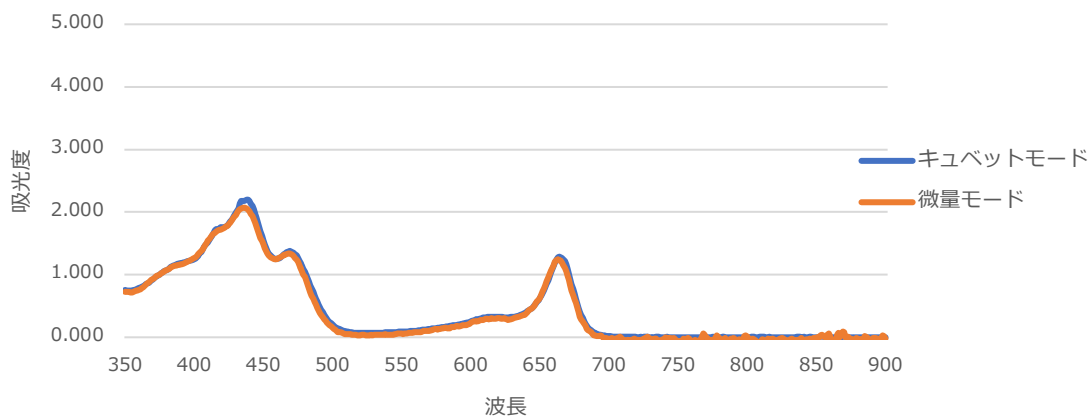


図 1-3. 葉緑体添加量 50 μL の時の、キュベットモードと微量モードのスペクトルの比較

次に、各波長の吸光度を表 2 に示しました。

表 2. 混合溶液の測定結果(吸光度)

測定モード	葉緑体添加量 (μL)	650nm		665nm		750nm	
		平均値 (n=3)	標準偏差 (n=3)	平均値 (n=3)	標準偏差 (n=3)	平均値 (n=3)	標準偏差 (n=3)
キュベット	200	1.356	0.026	2.593	0.061	0.021	0.015
	100	0.637	0.008	1.298	0.019	0.008	0.004
	50	0.360	0.004	0.712	0.005	0.015	0.005
	25	0.159	0.008	0.305	0.010	0.013	0.006
微量	200	1.498	0.024	2.820	0.029	0.019	0.007
	100	0.681	0.049	1.259	0.089	0.031	0.026
	50	0.385	0.027	0.715	0.031	0.031	0.015
	25	0.157	0.014	0.296	0.012	0.010	0.008

吸光度から算出したクロロフィル濃度を表 3 に示しました。なお、葉緑体添加量 200 μL をキュベットモードで測定した時、665nm における吸光度の平均値は 2.593 でした。NanoPhotometer NP80-TOUCH のキュベットモードにおける吸光度測定範囲は 0~2.6A で、測定範囲の上限に非常に近いものでした。そのため葉緑体添加量 200 μL をキュベットモードで測定した時の吸光度は、クロロフィル濃度算出のための計算には使用しませんでした。

なお微量モードにおける吸光度測定範囲は 0.02~330A で、665nm における吸光度は測定範囲内でした。そのため微量モードでは葉緑体添加量 200・100・50・25 μL の 4 点全ての測定値を採用し、クロロフィル濃度を算出しました。

表 3. クロロフィル濃度 算出結果

測定モード	葉緑体の添加量 (μL)	Chl a		Chl b		Chl a+b	
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) (n=3)	標準偏差 (n=3)	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) (n=3)	標準偏差 (n=3)	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) (n=3)	標準偏差 (n=3)
キュベット	100	16.06	0.23	5.26	0.11	21.05	0.15
	50	8.63	0.13	2.88	0.12	11.53	0.04
	25	3.61	0.05	1.27	0.10	4.82	0.10
微量	200	33.93	0.23	15.31	0.32	49.50	0.53
	100	14.87	1.06	6.11	0.49	19.76	1.52
	50	8.35	0.19	3.65	0.23	12.20	0.42
	25	3.50	0.15	1.63	0.39	5.07	0.24

クロロフィル a、クロロフィル b、およびクロロフィル a+b について、直線性を確認しました。結果は図 3 に示しました。

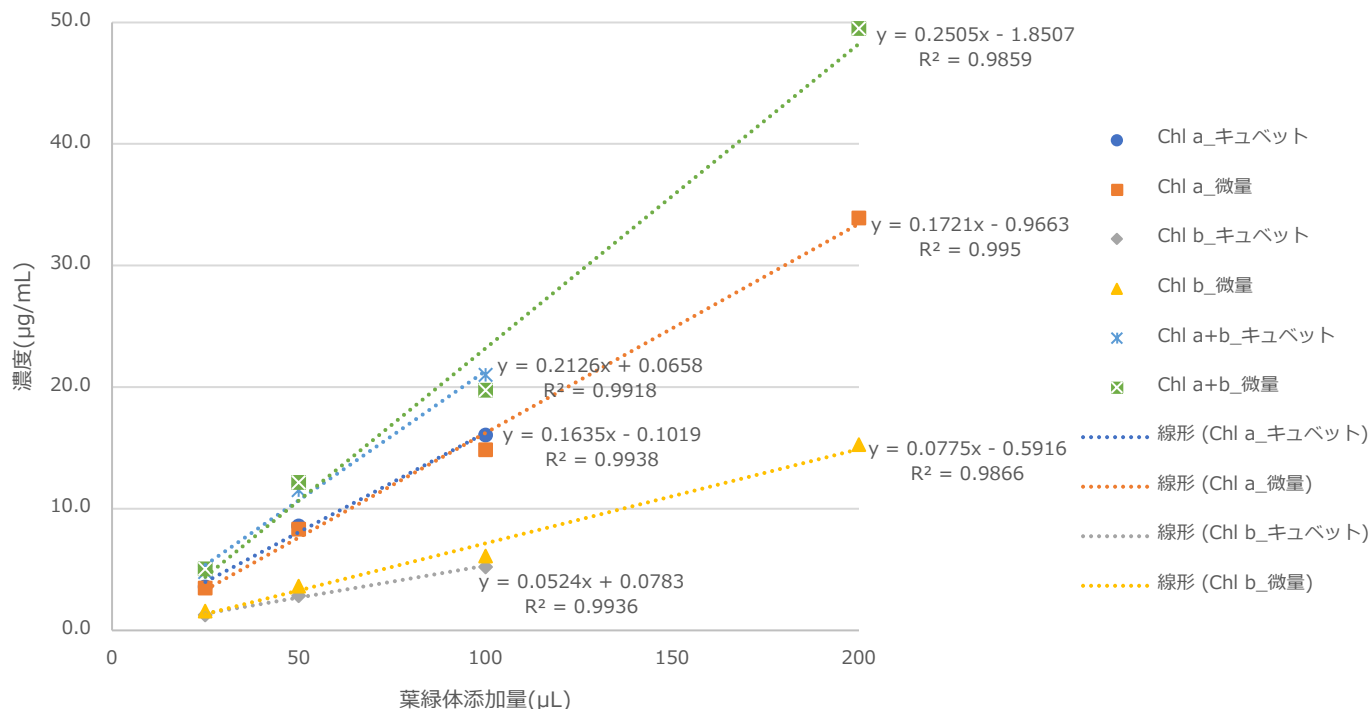


図 3. クロロフィルの濃度（キュベットモードおよび微量モード）

【結論】

NanoPhotometer NP80-TOUCH にて、メタノールで葉緑体懸濁液から抽出した試料溶液のクロロフィル a、クロロフィル b、クロロフィル a+b を定量できました。算出したクロロフィル濃度のプロット（図 3）より、クロロフィル a、クロロフィル b、クロロフィル a+b において、キュベットモードでは葉緑体添加量 25~100 µL の間、微量モードでは 25~200 µL の間で R²=1 に近い、高い直線性を得られました。

表 2 より 650nm および 665nm で得られた吸光度の標準偏差は共に低く、少ないばらつきで測定できていることが示されました。キュベットモードと微量モードの吸光度は、ほぼ同じであることが確認されたことから、サンプルが少量しかない場合やサンプル濃度が濃い場合には微量モードでの測定が有用であることが確認できました。

なお微量モードにおいて、Implen 社はサンプル量 1~2 µL での測定を推奨しています。今回使用したメタノールは表面張力が低く 2 µL では測定できないことがあったため、3 µL にて測定を行いました。メタノールなどの表面張力の低い溶液で測定を行う場合、サンプル量を通常よりも多くすることをお勧めします。

【参考文献】

1) Grimme and Boardman (1972) Biochem. Biophys. Res.Comm. 49: 1617-1623

【謝辞】

本アプリケーションのデータ測定につきまして、京都大学大学院 農学研究科 教授 伊福健太郎先生、同研究員 辻祥子様にご協力を賜りました。心より御礼申し上げます。