

维生素 B1（Vitamin B1，VB1）试剂盒说明书

微量法 100T/96S

注 意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

维生素 B1（Vitamin B1）是构成脱羧辅酶的主要成分，参与细胞代谢中的三羧酸循环，是维持机体正常代谢必须的水溶性维生素，在生物体能量代谢中有重要的作用。

测定原理：

VB1 在碱性条件下还原铁氰化钾生成亚铁氰化钾，亚铁氰化钾与 Fe^{3+} 在弱酸条件下生成普鲁士蓝，在 704nm 有特征吸收峰。

自备实验用品及仪器：

天平、研钵、离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、恒温水浴锅、蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体 70mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 1mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 2mL×1 支，4℃ 保存。

试剂三：液体 2mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

试剂四：液体 5mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂五：液体 3mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

样本处理：

1. 组织：将样品磨碎，按照质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g，加入 0.6mL 提取液）加入提取液，60℃ 浸提 30min，加蒸馏水 0.4mL，混匀后于 25℃，16000rpm 离心 10min，取上清测定（动物组织等蛋白含量较高的样本建议离心 20-30min）。
2. 细胞：按照细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 0.6mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；加蒸馏水 0.4mL，混匀后于 25℃，16000rpm 离心 10min，取上清测定。
3. 血清：直接测定。

测定操作：

	空白管	测定管
样品（ μL ）		20
试剂一（ μL ）	20	
试剂二（ μL ）	16	16
试剂三（ μL ）	20	20
充分混匀，80℃ 反应 10min		
提取液（ μL ）	16	16

试剂四 (μL)	44	44
试剂五 (μL)	24	24
H ₂ O (μL)	60	60
充分混匀, 静置 20min, 于微量石英比色皿/96 孔板, 蒸馏水调零, 测定 704nm 处吸光值, 记为 A 空白管和 A 测定管, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。		

计算公式:

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线: $y = 0.017x + 0.0031$, $R^2 = 0.9991$; x 为标准品浓度: μg/mL; y 为 ΔA (A 测定管-A 空白管)

1. 按照蛋白含量计算

$$\begin{aligned} \text{VB1 含量 (}\mu\text{g/mg prot)} &= (\Delta A - 0.0031) \div 0.017 \div \text{Cpr} \\ &= 58.8 \times (\Delta A - 0.0031) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{VB1 含量 (}\mu\text{g/g 鲜重)} &= (\Delta A - 0.0031) \div 0.017 \div (\text{W} \div \text{V 样总}) \\ &= 58.8 \times (\Delta A - 0.0031) \div \text{W} \end{aligned}$$

3. 按照细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{VB1 含量 (}\mu\text{g}/10^4 \text{ cell)} &= (\Delta A - 0.0031) \div 0.017 \div (\text{细胞数量} \div \text{V 样总}) \\ &= 58.8 \times (\Delta A - 0.0031) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

4. 按照液体体积计算

$$\begin{aligned} \text{VB1 含量 (}\mu\text{g/mL)} &= (\Delta A - 0.0031) \div 0.017 \\ &= 58.8 \times (\Delta A - 0.0031) \end{aligned}$$

V 样总: 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

标准曲线: $y = 0.0085x + 0.0031$, $R^2 = 0.9991$; x 为标准品浓度: μg/mL; y 为 ΔA (A 测定管-A 空白管)

1. 按照蛋白含量计算

$$\begin{aligned} \text{VB1 含量 (}\mu\text{g/mg prot)} &= (\Delta A - 0.0031) \div 0.0085 \div \text{Cpr} \\ &= 117.65 \times (\Delta A - 0.0031) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{VB1 含量 (}\mu\text{g/g 鲜重)} &= (\Delta A - 0.0031) \div 0.0085 \div (\text{W} \div \text{V 样总}) \\ &= 117.65 \times (\Delta A - 0.0031) \div \text{W} \end{aligned}$$

3. 按照细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{VB1 含量 (}\mu\text{g}/10^4 \text{ cell)} &= (\Delta A - 0.0031) \div 0.0085 \div (\text{细胞数量} \div \text{V 样总}) \\ &= 117.65 \times (\Delta A - 0.0031) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

4. 按照液体体积计算

$$\begin{aligned} \text{VB1 含量 (}\mu\text{g/mL)} &= (\Delta A - 0.0031) \div 0.0085 \\ &= 117.65 \times (\Delta A - 0.0031) \end{aligned}$$

V 样总: 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g

注意事项:

1. 若测定结果中吸光值超过 2, 请将样本稀释后进行测定, 并在计算公式中乘以稀释倍数。
2. 蛋白浓度较高的样品, 比如动物组织, 若显色完成后有沉淀产生, 将样本稀释后再重新测定, 并在计算公式中乘以稀释倍数。
3. 显色完成后立即进行测定。
4. 标准曲线线性范围为 0.1-10μg/mL。