

维生素 B1 (VB1) 检测试剂盒 (分光光度法)

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。

试剂组成和配制：

提取液：液体 35mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 1mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 5mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：液体 5mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

试剂四：液体 12mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂五：液体 6mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

样本处理：

- 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℃，13000g 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 20-30 分钟)。
- 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℃，13000g 离心 10min，取上清测定。
- 血清：**直接测定。

测定步骤表:

	空白管	测定管
样品 (μL)		100
试剂一 (μL)	100	
试剂二 (μL)	80	80
试剂三 (μL)	100	100
充分混匀, 80°C 反应 10min		
提取液 (μL)	80	80
试剂四 (μL)	220	220
试剂五 (μL)	120	120
H ₂ O (μL)	300	300
充分混匀, 静置 20min, 于 1mL 玻璃比色皿, 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:

标准曲线: $y = 0.017x + 0.0031$, $R^2 = 0.9991$; x 为标准品浓度: $\mu\text{g/mL}$; 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

注意事项:

- 若测定结果中吸光值超过 1, 请将样本稀释后进行测定, 并在计算公式中乘以稀释倍数。
- 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, 将样本稀释后再测定, 在计算公式中乘以稀释倍数。
- 显色完成后立即进行测定。
- 标准曲线线性范围为 0.1-10 $\mu\text{g/mL}$ 。