

维生素 E (VE) 检测试剂盒 (微量法)

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 E (Vitamin E) 是一种脂溶性维生素，其水解产物为生育酚，是生物体中最主要的抗氧化剂之一，能阻止不饱和脂肪酸收到过氧化作用的损伤，维持不饱和脂肪酸细胞膜的完整性和正常功能，具有延缓衰老、预防溶血性贫血作用，在医药、化妆品、保健品、食品行业具有较高的应用价值。

测定原理：

VE 还原 Fe^{3+} 为 Fe^{2+} ， Fe^{2+} 与 1,10-菲罗啉产生有色络合物，在 530nm 有特征吸收峰。

试剂组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 2mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

试剂二：液体 2mL×1 支，4℃ 保存。

试剂三：液体 2mL×1 支，4℃ 保存。

试剂四：液体 6mL×1 瓶，4℃ 保存。

样本处理：

- 组织：**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 1mL 提取液）加入提取液，匀浆后用提取液定至 1mL，定至在漩涡混匀仪上震荡 5min，于 25℃，5000g 离心 10min，取上层测定。
- 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 1mL 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）后在漩涡混匀仪上震荡 5min，于 25℃，5000g 离心 10min，取上层测定。
- 血清：**取 0.1mL，加 0.9mL 提取液，漩涡仪混匀上震荡 5min，于 25℃，5000g 离心 10min，取上层测定。

测定步骤：

	对照管	测定管
样品 (μL)	100	100
试剂一 (μL)	20	20
试剂二 (μL)		20
试剂三 (μL)	20	
充分混匀，25℃ 反应 5min		
试剂四 (μL)	60	60
充分混匀，于微量石英比色皿/96 孔板，无水乙醇调零，测定 530nm 处吸光值，记为 A 对照管和 A 测定管， $\Delta A = A_{测定管} - A_{对照管}$ 。		

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: $y = 0.22x + 0.0065$ $R^2 = 0.9978$

1. 按照蛋白含量计算

$$\begin{aligned} \text{VE 含量 } (\mu\text{g}/\text{mg prot}) &= (\Delta A - 0.0065) \div 0.22 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \\ &= 9.09 \times (\Delta A - 0.0065) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{VE 含量 } (\mu\text{g}/\text{g}) &= (\Delta A - 0.0065) \div 0.22 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \\ &= 9.09 \times (\Delta A - 0.0065) \div W \end{aligned}$$

3. 按照细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{VE 含量 } (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta A - 0.0065) \div 0.22 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \\ &= 9.09 \times (\Delta A - 0.0065) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

4. 按照液体体积计算

$$\begin{aligned} \text{VE 含量 } (\mu\text{g}/\text{mL}) &= (\Delta A - 0.0065) \div 0.22 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \times 10 \\ &= 90.9 \times (\Delta A - 0.0065) \end{aligned}$$

V 反总: 反应总体积, 0.2mL;

V 样: 加入样本体积, 0.1mL;

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: $y = 0.11x + 0.0065$ $R^2 = 0.9978$

1. 按照蛋白含量计算

$$\begin{aligned} \text{VE 含量 } (\mu\text{g}/\text{mg prot}) &= (\Delta A - 0.0065) \div 0.11 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \\ &= 18.18 \times (\Delta A - 0.0065) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{VE 含量 } (\mu\text{g}/\text{g}) &= (\Delta A - 0.0065) \div 0.11 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \\ &= 18.18 \times (\Delta A - 0.0065) \div W \end{aligned}$$

3. 按照细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{VE 含量 } (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta A - 0.0065) \div 0.11 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \\ &= 18.18 \times (\Delta A - 0.0065) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

4. 按照液体体积计算

$$\begin{aligned} \text{VE 含量 } (\mu\text{g}/\text{mL}) &= (\Delta A - 0.0065) \div 0.11 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \times 10 \\ &= 181.8 \times (\Delta A - 0.0065) \end{aligned}$$

V 反总: 反应总体积, 0.2mL;

V 样: 加入样本体积, 0.1mL;

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:

若反应体系产生沉淀, 需要将样品进行适当的稀释, 并在计算公式中乘以稀释倍数。