

## 维生素 B1 (VB1) 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 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 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：

- 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**)。
- 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。
- 血清：**直接测定。

### 测定步骤表：

	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 <sub>2</sub> 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:  $\mu\text{g/mL}$ ;  $y$  为  $\Delta A$  (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:  $\mu\text{g/mL}$ ;  $y$  为  $\Delta A$  (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 0.1-10 $\mu\text{g/mL}$ 。