

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0522

Size: 100T/96S

维生素 B6 (VB6) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

维生素 B6 (Vitamin B6) 又称吡哆素, 其包括吡哆醇、吡哆醛及吡哆胺, 在体内以磷酸酯的形式存在, 是一种水溶性维生素, 在细胞中参与多种蛋白质和氨基酸的代谢, 对生物体具有极其重要的作用。

二、测定原理:

VB6 与 4-氨基安替比林在强氧化剂作用下生成稳定的黄色化合物, 在 390nm 有特征吸收峰。

三、需自备的仪器和用品:

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。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 70mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 1mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	液体 5mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂三	液体 8mL×1 瓶	4°C 避光保存	
试剂四	液体 8mL×1 瓶	4°C 避光保存	

五、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°C浸提 30min, 加蒸馏水 0.4mL, 混匀后于 25°C, 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 20-30 分钟)。

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°C, 16000rpm 离心 10min, 取上清测定。

3. 血清: 直接测定。

六、测定操作

	空白管	测定管
样品 (μL)		40
试剂一 (μL)	40	
试剂二 (μL)	40	40
试剂三 (μL)	60	60
试剂四 (μL)	60	60
充分混匀, 25°C反应 20min, 于微量石英比色皿/96 孔板, 测定 390nm 处吸光值, 记为 A 空白管和 A 测定管, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。空白管只要做一管。		

六、计算公式

- 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线: $y = 0.3635x + 0.0205$, $R^2 = 0.9986$

1. 按照蛋白含量计算

VB6 含量 ($\mu\text{g}/\text{mg prot}$) = $(\Delta A - 0.0205) \div 0.3635 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}})$

$$=13.76 \times (\Delta A - 0.0205) \div C_{pr}$$

2. 按照样本质量计算

$$VB6 \text{ 含量 } (\mu\text{g/g}) = (\Delta A - 0.0205) \div 0.3635 \times V_{\text{反总}} \div (\text{样} \times W \div V_{\text{样总}})$$

$$=13.76 \times (\Delta A - 0.0205) \div W$$

3. 按照细胞数量计算

$$VB6 \text{ 含量 } (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = (\Delta A - 0.0205) \div 0.3635 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}})$$

$$= 13.76 \times (\Delta A - 0.0205 \div \text{细胞数量})$$

4. 按照液体体积计算

$$VB6 \text{ 含量 } (\mu\text{g/mL}) = (\Delta A - 0.0205) \div 0.3635 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} = 13.76 \times (\Delta A - 0.0205)$$

$V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 0.2mL; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.04mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; C_{pr} : 蛋白浓度, mg/mL; W : 样本质量, g

● 用 96 孔板测定的计算公式如下

标准曲线: $y = 0.1818x + 0.0205$, $R^2 = 0.9986$

1. 按照蛋白含量计算

$$VB6 \text{ 含量 } (\mu\text{g/mg prot}) = (\Delta A - 0.0205) \div 0.1818 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{pr})$$

$$= 27.52 \times (\Delta A - 0.0205) \div C_{pr}$$

2. 按照样本质量计算

$$VB6 \text{ 含量 } (\mu\text{g/g}) = (\Delta A - 0.0205) \div 0.1818 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}})$$

$$= 27.52 \times (\Delta A - 0.0205 \div W)$$

3. 按照细胞数量计算

$$VB6 \text{ 含量 } (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = (\Delta A - 0.0205) \div 0.1818 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}})$$

总) = $27.52 \times (\Delta A - 0.0205) \div \text{细胞数量}$

4. 按照液体体积计算

VB6 含量 ($\mu\text{g/mL}$) = $(\Delta A - 0.0205) \div 0.1818 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} = 27.52 \times (\Delta A - 0.0205)$

$V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 0.2mL; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.04mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; C_{pr} : 蛋白浓度, mg/mL; W : 样本质量, g

七、注意事项

1. 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。
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, 将样本稀释后再测定, 在计算公式中乘以稀释倍数。
3. 显色完成后立即进行测定。