

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-S0797

Size: 50T/48S

维生素 B6 (VB6) 检测试剂盒说明书

分光光度法

*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、恒温水浴锅、1mL 玻璃比色皿、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 35mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 1mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	液体 12mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂三	液体 18mL×1 瓶	4°C 避光保存	
试剂四	液体 18mL×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 (μ L)		200
试剂一 (μ L)	200	
试剂二 (μ L)	200	200
试剂三 (μ L)	300	300
试剂四 (μ L)	300	300

充分混匀,25°C反应 20min,于 1mL 玻璃比色皿,蒸馏水调零,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。

七、计算公式

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 (μ g/mg prot) = $(\Delta A - 0.0205) \div 0.3635 \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times C_{pr})$

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

2. 按照样本质量计算

$$\text{VB6 含量} (\mu\text{g/g}) = (\Delta A - 0.0205) \div 0.36359 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}})$$

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

3. 按照细胞数量计算

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

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

4. 按照液体体积计算

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

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

八、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。