

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-S0916

Size: 50T/48S

## 维生素 B1 (VB1) 检测试剂盒说明书

### 可见分光光度法

\*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 B1 (Vitamin B1) 又称硫胺素, 以辅酶形式参与糖的分解代谢, 在生物体能量代谢中有重要的作用。

#### 二、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, 测定普鲁士蓝在 704nm 下的特征吸收峰, 即可反映 VB1 的含量。

#### 三、需自备的仪器和用品:

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、1mL 玻璃比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器、EP 管、冰和蒸馏水。

#### 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	
稀释液	液体 60mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 6mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂二	液体 7mL × 1 瓶	4°C 避光保存	
试剂三	液体 6mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂四	液体 15mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂五	液体 8mL × 1 瓶	4°C 避光保存	

标准品	粉剂×1 支	4°C避光保存	10mg 维生素 B1, 临用前加入 1mL 稀释液, 配成 10mg/mL (即 10000µg/mL) 的标准液。
-----	--------	---------	---

## 五、操作步骤:

### ● 粗酶液提取:

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, 13000g 离心 10min, 取上清测定 (动物组织、豆类种子等蛋白含量较高的样本建议离心 20-30 分钟或反复离心 2-3 次至上清无浑浊)

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, 13000g 离心 10min, 取上清测定。

液体: 直接检测。

## 六、测定步骤:

1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 704nm, 蒸馏水调零。

2、将 10mg/mL (10000µg/mL) 标准液用稀释液稀释为 125.62.5、31.25、15.625、7.8125、3.9、2µg/mL 的标准溶液备用。

3、操作表: 在 1.5mLEP 管中进行下列操作。

	测定管	标准管	空白管
样品 (µL)	100	-	-
稀释液 (µL)	-	-	100
标准品溶液 (µL)	-	100	-
试剂一 (µL)	80	80	80
试剂二 (µL)	100	100	100

充分混匀，80°C水浴反应 30min。			
试剂三 (μL)	80	80	80
试剂四 (μL)	220	220	220
试剂五 (μL)	120	120	120
蒸馏水 (μL)	300	300	300

充分混匀，测定 704nm 处吸光值 A，计算  $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。空白管只需做一次。

## 七、维生素 B1 含量计算

### 1、标准曲线的绘制：

以各个标准溶液的浓度为 x 轴，其对应的  $\Delta A$  标准为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程  $y = kx + b$ ，将  $\Delta A$  带入方程得 x ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

### 2、维生素 B1 含量的计算：

#### (1) 按蛋白浓度计算

$$VB1 (\mu\text{g} / \text{mg prot}) = x \times V_{\text{样总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样总}}) = x \div C_{\text{pr}}$$

#### (2) 按样本质量计算

$$VB1 (\mu\text{g} / \text{g 鲜重}) = x \times V_{\text{样总}} \div W = x \div W$$

#### (3) 按照细胞数量计算

$$VB1 (\mu\text{g} / 10^4 \text{ cell}) = x \times V_{\text{样总}} \div (\text{细胞数量 (万个)}) = x \div (\text{细胞数量 (万个)})$$

#### (4) 按液体体积计算

$$VB1 (\mu\text{g} / \text{mL}) = x$$

V 样总：样本总体积，1mL； Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL； W：样本质量，g。

## 八、注意事项

- 1、A 大于 0.8 时, 建议将样品用提取液稀释后再进行测定, 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, 豆类种子等建议将样本稀释 20 倍或 40 倍后再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, 若显色完成后有沉淀产生, 将其摇匀后测定。
- 4、标准曲线线性范围为 0.5-125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。