

上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

维生素B1 (Vitamin B1, VB1) 试剂盒说明书

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。

自备实验用品及仪器

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。

试剂组成和配制

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℃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 支	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

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℃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）。
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℃，16000rpm 离心10min，取上清测定。
3. 血清：直接测定。

测定操作

	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°C反应 10min		
提取液 (μL)	16	16
试剂四 (μL)	44	44
试剂五 (μL)	24	24
H ₂ 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: $y = 0.1902x - 0.1833$, $R^2 = 0.9991$

1. 按照蛋白含量计算

$$\begin{aligned} \text{VB1 含量 } (\mu\text{g}/\text{mg prot}) &= (\Delta A + 0.1833) \div 0.1902 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \\ &= 52.58 \times (\Delta A + 0.1833) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{VB1 含量 } (\mu\text{g}/\text{g}) &= (\Delta A + 0.1833) \div 0.1902 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \\ &= 52.58 \times (\Delta A + 0.1833) \div W \end{aligned}$$

3. 按照细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{VB1 含量 } (\mu\text{g}/10^4\text{cell}) &= (\Delta A + 0.1833) \div 0.1902 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \\ &= 52.58 \times (\Delta A + 0.1833) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

4. 按照液体体积计算

$$\begin{aligned} \text{VB1 含量 } (\mu\text{g}/\text{mL}) &= (\Delta A + 0.1833) \div 0.1902 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \\ &= 52.58 \times (\Delta A + 0.1833) \end{aligned}$$

$V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 0.2mL; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.02mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL;

C_{pr} : 蛋白浓度, mg/mL; W : 样本质量, g

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

标准曲线: $y = 0.0951x - 0.1833$, $R^2 = 0.9991$

1. 按照蛋白含量计算

$$\begin{aligned} \text{VB1 含量 } (\mu\text{g}/\text{mg prot}) &= (\Delta A + 0.1833) \div 0.0951 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \\ &= 105.16 \times (\Delta A + 0.1833) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{VB1 含量 } (\mu\text{g}/\text{g}) &= (\Delta A + 0.1833) \div 0.0951 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \\ &= 105.16 \times (\Delta A + 0.1833) \div W \end{aligned}$$

3. 按照细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{VB1 含量 } (\mu\text{g}/10^4\text{cell}) &= (\Delta A + 0.1833) \div 0.0951 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \\ &= 105.16 \times (\Delta A + 0.1833) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

4. 按照液体体积计算

$$\begin{aligned} \text{VB1 含量 } (\mu\text{g/mL}) &= (\Delta A + 0.1833) \div 0.0951 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \\ &= 105.16 \times (\Delta A + 0.1833) \end{aligned}$$

$V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 0.2mL; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.02mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; C_{pr} : 蛋白浓度, mg/mL; W : 样本质量, g

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。