

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 B6 检测试剂盒说明书

### 可见分光光度法

**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。**

产品内容：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 36mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 40mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂四	粉剂×1 瓶	4℃避光保存	临用前加入 40mL 蒸馏水混匀，如果一次性用不完，可分装于-20℃保存待用。
标准品	粉剂×1 支	4℃保存	10mg 维生素 B6，临用前加入 1mL 试剂一，配成 10mg/mL（即10000 μg/mL）的标准液

产品说明：

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，肉类、全谷类、蔬菜和坚果类中含量较高。在机体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。

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 400nm 有特征吸收峰。

实验中所需的仪器和试剂：

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、蒸馏水。

操作步骤：

#### 一、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℃浸提 30min，加蒸馏水 0.4mL，混匀后于 25℃，16000rpm 离心 10min，取上清测定（动物组织及其他蛋白含量较高的样本建议离心 20-30 分钟或反复离心 2-3 次至上清无混浊）。

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, 16000rpm 离心 10min, 取上清测定。

液体：直接检测

## 二、测定步骤：

- 1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 400nm，蒸馏水调零。
- 2、将 10mg/mL (10000  $\mu\text{g/mL}$ ) 标准液用试剂一稀释为 125、62.5、31.25、15.625、7.8125  $\mu\text{g/mL}$  的标准溶液备用。
- 3、操作表：在 1.5ml 离心管中依次加入下列试剂：

	样品对照管	样品测定管	标准管	空白管	空白对照管
样品 ( $\mu\text{L}$ )	200	200	-	-	-
试剂一 ( $\mu\text{L}$ )	-	-	-	200	200
标准溶液 ( $\mu\text{g/mL}$ )	-	-	200	-	-
试剂二 ( $\mu\text{L}$ )	200	200	200	200	200
试剂三 ( $\mu\text{L}$ )	300	300	300	300	300
试剂四 ( $\mu\text{L}$ )	-	300	300	300	-
蒸馏水 ( $\mu\text{L}$ )	300	-	-	-	300

充分混匀，25°C反应 20min，测定 400nm 处吸光值，记为 A 样品测定管和 A 样品对照管、A 空白管、A 空白对照管， $\Delta A = (A \text{ 样本测定管} - A \text{ 样本对照管}) - (A \text{ 空白管} - A \text{ 空白对照管})$ 。空白管、空白对照管只要做一管。

## 三、维生素 B6 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  $\Delta A$  带入方程得到 x ( $\mu\text{g/mL}$ )
- 2、维生素 B6 含量的计算：
  - (1) 按蛋白浓度计算  
$$\text{VB6} (\mu\text{g/mg prot}) = x \times V_{\text{提取}} \div (V_{\text{提取}} \times C_{\text{pr}}) = x \div C_{\text{pr}}$$
  - (2) 按样本质量计算  
$$\text{VB6} (\mu\text{g/g 鲜重}) = x \times V_{\text{提取}} \div W = x \div W$$
  - (3) 按照细胞数量计算  
$$\text{VB6} (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = x \times V_{\text{提取}} \div \text{细胞数量 (万个)} = x \div \text{细胞数量 (万个)}$$
  - (4) 按液体体积计算  
$$\text{VB6} (\mu\text{g/mL}) = x \times V_{\text{提取}} \div V_{\text{提取}} = x$$
  
V 提取：提取液体积，1mL； V 样：加入的样品体积，0.04mL； Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL； W：样本质量，g。

**注意事项：**

- 1、 A 大于 0.8 时，建议将样品用试剂一稀释后再进行测定，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，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，尽量保证反应时间一致。