

维生素 B1 (Vitamin B1, VB1) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

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、恒温水浴锅、1 mL 玻璃比色皿、蒸馏水。

试剂组成和配制

提取液：液体 35mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 1mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 5mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：液体 5mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

试剂四：液体 12mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂五：液体 6mL×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℃，13000g 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℃，13000g 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)		100
试剂一 (μL)	100	
试剂二 (μL)	80	80
试剂三 (μL)	100	100
充分混匀，80℃ 反应 10min		
提取液 (μL)	80	80
试剂四 (μL)	220	220
试剂五 (μL)	120	120
H ₂ O (μL)	300	300
充分混匀，静置 20min，于 1mL 玻璃比色皿，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

标准曲线： $y = 0.017x + 0.0031$ ， $R^2 = 0.9991$ ；x 为标准品浓度：μg/mL；y 为 ΔA (A 测定管 - A 空白管)

1. 按照蛋白含量计算

$$\begin{aligned}\text{VB1 含量 } (\mu\text{g}/\text{mg prot}) &= (\Delta\text{A}-0.0031) \div 0.017 \div \text{Cpr} \\ &= 58.8 \times (\Delta\text{A}-0.0031) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

$$\begin{aligned}\text{VB1 含量 } (\mu\text{g}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta\text{A}-0.0031) \div 0.017 \div (\text{W} \div \text{V 样总}) \\ &= 58.8 \times (\Delta\text{A}-0.0031) \div \text{W}\end{aligned}$$

3. 按照细胞数量计算

$$\begin{aligned}\text{VB1 含量 } (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta\text{A}-0.0031) \div 0.017 \div (\text{细胞数量} \div \text{V 样总}) \\ &= 58.8 \times (\Delta\text{A}-0.0031) \div \text{细胞数量}\end{aligned}$$

4. 按照液体体积计算

$$\begin{aligned}\text{VB1 含量 } (\mu\text{g}/\text{mL}) &= (\Delta\text{A}-0.0031) \div 0.017 \\ &= 58.8 \times (\Delta\text{A}-0.0031)\end{aligned}$$

V 样总: 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 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 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。
4. 标准曲线线性范围为 0.1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。