

维生素E (Vitamin E, VE) 试剂盒说明书

微量法100T/48S

测定意义

维生素E (Vitamin E) 是一种脂溶性维生素，其水解产物为生育酚，是生物体中最主要的抗氧化剂之一，能阻止不饱和脂肪酸收到过氧化作用的损伤，维持不饱和脂肪酸细胞膜的完整性和正常功能，具有延缓衰老、预防溶血性贫血作用，在医药、化妆品、保健品、食品行业具有较高的应用价值。

测定原理

VE还原 Fe^{3+} 为 Fe^{2+} ， Fe^{2+} 与1,10-菲罗啉产生有色络合物，在530nm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、漩涡震荡仪。

试剂组成和配制

提取液：液体100mL×1瓶，4°C保存。

试剂一：液体2mL×1瓶，4°C避光保存。

试剂二：液体2mL×1支，4°C保存。

试剂三：液体2mL×1支，4°C保存。

试剂四：液体6mL×1瓶，4°C保存。

样本处理

1. 组织：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1mL提取液) 加入提取液，匀浆后用提取液定至1mL，定至在漩涡混匀仪上震荡5min，于25°C，5000g离心10min，取上层测定。
2. 细胞：按照细胞数量 (10⁴个) : 提取液体积 (mL) 为500~1000: 1的比例 (建议500万细胞加入1mL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) 后在漩涡混匀仪上震荡5min，于25°C，5000g离心10min，取上层测定。
3. 血清：取0.1mL，加0.9mL提取液，漩涡仪混匀上震荡5min，于25°C，5000g离心10min，取上层测定。

测定操作

	对照管	测定管
样品 (μL)	100	100
试剂一 (μL)	20	20
试剂二 (μL)		20
试剂三 (μL)	20	
充分混匀，25°C反应5min		
试剂四 (μL)	60	60

充分混匀，于微量石英比色皿/96孔板，无水乙醇调零，测定530nm处吸光值，记为A对照管和A测定管， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。

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: $y = 0.22x + 0.0065$ $R^2 = 0.9978$

1. 按照蛋白含量计算

$$\begin{aligned} \text{VE含量} (\mu\text{g}/\text{mg prot}) &= (\Delta A - 0.0065) \div 0.22 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \\ &= 9.09 \times (\Delta A - 0.0065) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{VE含量} (\mu\text{g}/\text{g}) &= (\Delta A - 0.0065) \div 0.22 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \\ &= 9.09 \times (\Delta A - 0.0065) \div W \end{aligned}$$

3. 按照细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{VE含量} (\mu\text{g}/104 \text{ cell}) &= (\Delta A - 0.0065) \div 0.22 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \\ &= 9.09 \times (\Delta A - 0.0065) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

4. 按照液体体积计算

$$\begin{aligned} \text{VE含量} (\mu\text{g}/\text{mL}) &= (\Delta A - 0.0065) \div 0.22 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \times 10 \\ &= 90.9 \times (\Delta A - 0.0065) \end{aligned}$$

V反总: 反应总体积, 0.2mL; V样: 加入样本体积, 0.1mL; V样总: 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 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: $y = 0.11x + 0.0065$ $R^2 = 0.9978$

1. 按照蛋白含量计算

$$\begin{aligned} \text{VE含量} (\mu\text{g}/\text{mg prot}) &= (\Delta A - 0.0065) \div 0.11 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \\ &= 18.18 \times (\Delta A - 0.0065) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{VE含量} (\mu\text{g}/\text{g}) &= (\Delta A - 0.0065) \div 0.11 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \\ &= 18.18 \times (\Delta A - 0.0065) \div W \end{aligned}$$

3. 按照细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{VE含量} (\mu\text{g}/104 \text{ cell}) &= (\Delta A - 0.0065) \div 0.11 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \\ &= 18.18 \times (\Delta A - 0.0065) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

4. 按照液体体积计算

$$\begin{aligned} \text{VE含量} (\mu\text{g}/\text{mL}) &= (\Delta A - 0.0065) \div 0.11 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \times 10 \\ &= 181.8 \times (\Delta A - 0.0065) \end{aligned}$$

V反总: 反应总体积, 0.2mL; V样: 加入样本体积, 0.1mL; 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

若反应体系产生沉淀, 需要将样品进行适当的稀释, 并在计算公式中乘以稀释倍数。

www.affandi-e.com