

维生素B1 (Vitamin B1, VB1) 试剂盒说明书

微量法100T/96S

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Fe³⁺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

提取液：液体70mL×1瓶，4°C保存。

试剂一：液体1mL×1瓶，4°C保存。

试剂二：液体2mL×1支，4°C保存。

试剂三：液体2mL×1瓶，4°C避光保存。

试剂四：液体5mL×1瓶，4°C保存。

试剂五：液体3mL×1瓶，4°C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°C浸提30min，加蒸馏水0.4mL，混匀后于25°C，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（10⁴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。
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
H2O (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: $y = 0.017x + 0.0031$, $R^2 = 0.9991$; x为标准品浓度: $\mu\text{g/mL}$; y为 ΔA (A测定管-A空白管)

1. 按照蛋白含量计算

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

2. 按照样本质量计算

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

3. 按照细胞数量计算

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

4. 按照液体体积计算

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

V样总: 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g

b. 用96孔板测定的计算公式如下

标准曲线: $y = 0.0085x + 0.0031$, $R^2 = 0.9991$; x为标准品浓度: $\mu\text{g/mL}$; y为 ΔA (A测定管-A空白管)

1. 按照蛋白含量计算

$$\begin{aligned} \text{VBI含量} (\mu\text{g/mg prot}) &= (\Delta A - 0.0031) \div 0.0085 \div \text{Cpr} \\ &= 117.65 \times (\Delta A - 0.0031) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

$$\text{VBI含量} (\mu\text{g/g鲜重}) = (\Delta A - 0.0031) \div 0.0085 \div (\text{W} \div \text{V样总})$$

$$= 117.65 \times (\Delta A - 0.0031) \div W$$

3. 按照细胞数量计算

$$\text{VBI含量} (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = (\Delta A - 0.0031) \div 0.0085 \div (\text{细胞数量} \div V_{\text{样总}})$$

$$= 117.65 \times (\Delta A - 0.0031) \div \text{细胞数量}$$

4. 按照液体体积计算

$$\text{VBI含量} (\mu\text{g}/\text{mL}) = (\Delta A - 0.0031) \div 0.0085$$

$$= 117.65 \times (\Delta A - 0.0031)$$

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。
4. 标准曲线线性范围为0.1-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。