

维生素B6 (Vitamin B6, VB6) 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，在细胞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。

测定原理

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390nm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5mL×1瓶，4°C保存。

试剂三：液体8mL×1瓶，4°C避光保存。

试剂四：液体8mL×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20-30分钟）。
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)		40
试剂一 (μL)	40	
试剂二 (μL)	40	40
试剂三 (μL)	60	60
试剂四 (μL)	60	60

充分混匀，25°C反应20min，于微量石英比色皿/96孔板，测定390nm处吸光值，记为A空白管和A测定管， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。空白管只要做一管。

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: $y = 0.3635x + 0.0205$, $R^2 = 0.9986$

1. 按照蛋白含量计算

$$\begin{aligned} \text{VB6含量} (\mu\text{g}/\text{mg prot}) &= (\Delta A - 0.0205) \div 0.3635 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \\ &= 13.76 \times (\Delta A - 0.0205) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{VB6含量} (\mu\text{g}/\text{g}) &= (\Delta A - 0.0205) \div 0.3635 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \\ &= 13.76 \times (\Delta A - 0.0205) \div W \end{aligned}$$

3. 按照细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{VB6含量} (\mu\text{g}/104 \text{ cell}) &= (\Delta A - 0.0205) \div 0.3635 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \\ &= 13.76 \times (\Delta A - 0.0205) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

4. 按照液体体积计算

$$\begin{aligned} \text{VB6含量} (\mu\text{g}/\text{mL}) &= (\Delta A - 0.0205) \div 0.3635 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \\ &= 13.76 \times (\Delta A - 0.0205) \end{aligned}$$

V反总: 反应总体积, 0.2mL; V样: 加入样本体积, 0.04mL; 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: $y = 0.1818x + 0.0205$, $R^2 = 0.9986$

1. 按照蛋白含量计算

$$\begin{aligned} \text{VB6含量} (\mu\text{g}/\text{mg prot}) &= (\Delta A - 0.0205) \div 0.1818 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \\ &= 27.52 \times (\Delta A - 0.0205) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{VB6含量} (\mu\text{g}/\text{g}) &= (\Delta A - 0.0205) \div 0.1818 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \\ &= 27.52 \times (\Delta A - 0.0205) \div W \end{aligned}$$

3. 按照细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{VB6含量} (\mu\text{g}/104 \text{ cell}) &= (\Delta A - 0.0205) \div 0.1818 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \\ &= 27.52 \times (\Delta A - 0.0205) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

4. 按照液体体积计算

$$\text{VB6含量} (\mu\text{g}/\text{mL}) = (\Delta A - 0.0205) \div 0.1818 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}}$$

$$=27.52 \times (\Delta A - 0.0205)$$

V反总: 反应总体积, 0.2mL; V样: 加入样本体积, 0.04mL; 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。

www.affandi-e.com