

## 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  $\text{Fe}^{3+}$  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（ $\mu\text{L}$ ）		100
试剂一（ $\mu\text{L}$ ）	100	
试剂二（ $\mu\text{L}$ ）	80	80
试剂三（ $\mu\text{L}$ ）	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 <sub>2</sub> 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， $\Delta A = A$ 测定管 - A 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： $\mu\text{g/mL}$ ；y 为  $\Delta A$  (A 测定管 - A 空白管)

1. 按照蛋白含量计算

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

2. 按照样本质量计算

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

3. 按照细胞数量计算

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

4. 按照液体体积计算

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

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

**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 0.1-10 $\mu\text{g/mL}$ 。