

## 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℃ 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 8mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

试剂四：液体 8mL×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℃，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（ $10^4$  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℃，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（ $\mu\text{L}$ ）		40
试剂一（ $\mu\text{L}$ ）	40	
试剂二（ $\mu\text{L}$ ）	40	40
试剂三（ $\mu\text{L}$ ）	60	60
试剂四（ $\mu\text{L}$ ）	60	60

充分混匀，25℃ 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

$$\text{VB6 含量 } (\mu\text{g}/\text{mg prot}) = (\Delta A - 0.0205) \div 0.3635 \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \\ = 13.76 \times (\Delta A - 0.0205) \div \text{Cpr}$$

2. 按照样本质量计算

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

3. 按照细胞数量计算

$$\text{VB6 含量 } (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = (\Delta A - 0.0205) \div 0.3635 \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times \text{细胞数量} \div V \text{ 样总}) \\ = 13.76 \times (\Delta A - 0.0205) \div \text{细胞数量}$$

4. 按照液体体积计算

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

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

$$\text{VB6 含量 } (\mu\text{g}/\text{mg prot}) = (\Delta A - 0.0205) \div 0.1818 \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \\ = 27.52 \times (\Delta A - 0.0205) \div \text{Cpr}$$

2. 按照样本质量计算

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

3. 按照细胞数量计算

$$\text{VB6 含量 } (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = (\Delta A - 0.0205) \div 0.1818 \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times \text{细胞数量} \div V \text{ 样总}) \\ = 27.52 \times (\Delta A - 0.0205) \div \text{细胞数量}$$

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。