

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 (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℃，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℃ 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

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

3. 按照细胞数量计算

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

4. 按照液体体积计算

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

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, R² = 0.9986

1. 按照蛋白含量计算

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

2. 按照样本质量计算

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

3. 按照细胞数量计算

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

4. 按照液体体积计算

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

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

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。