

维生素 E (Vitamin E, VE) 试剂盒说明书

微量法 100T/48S

测定意义

维生素 E (Vitamin E) 是一种脂溶性维生素, 其水解产物为生育酚, 是生物体中最主要的抗氧化剂之一, 能阻止不饱和脂肪酸收到过氧化作用的损伤, 维持不饱和脂肪酸细胞膜的完整性和正常功能, 具有延缓衰老、预防溶血性贫血作用, 在医药、化妆品、保健品、食品行业具有较高的应用价值。

测定原理

VE 还原 Fe^{3+} 为 Fe^{2+} , Fe^{2+} 与 1,10-菲罗啉产生有色络合物, 在 530nm 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、漩涡震荡仪。

试剂组成和配制

提取液: 液体 100mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂一: 液体 2mL×1 瓶, 4℃ 避光保存。

试剂二: 液体 2mL×1 支, 4℃ 保存。

试剂三: 液体 2mL×1 支, 4℃ 保存。

试剂四: 液体 6mL×1 瓶, 4℃ 保存。

样本处理

1. 组织: 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 1mL 提取液) 加入提取液, 匀浆后用提取液定至 1mL, 定至在漩涡混匀仪上震荡 5min, 于 25℃, 5000g 离心 10min, 取上层测定。
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 1mL 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) 后在漩涡混匀仪上震荡 5min, 于 25℃, 5000g 离心 10min, 取上层测定。
3. 血清: 取 0.1mL, 加 0.9mL 提取液, 漩涡仪混匀上震荡 5min, 于 25℃, 5000g 离心 10min, 取上层测定。

测定操作

	对照管	测定管
样品 (μ L)	100	100
试剂一 (μ L)	20	20
试剂二 (μ L)		20
试剂三 (μ L)	20	
充分混匀, 25℃ 反应 5min		
试剂四 (μ L)	60	60
充分混匀, 于微量石英比色皿/96 孔板, 无水乙醇调零, 测定 530nm 处吸光值, 记为 A 对照管和 A 测定管, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。		

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: $y = 0.22x + 0.0065$ $R^2 = 0.9978$

1. 按照蛋白含量计算

$$\begin{aligned} \text{VE 含量} (\mu\text{g}/\text{mg prot}) &= (\Delta A - 0.0065) \div 0.22 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \\ &= 9.09 \times (\Delta A - 0.0065) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

$$\begin{aligned}\text{VE 含量 } (\mu\text{g/g}) &= (\Delta A - 0.0065) \div 0.22 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \\ &= 9.09 \times (\Delta A - 0.0065) \div W\end{aligned}$$

3. 按照细胞数量计算

$$\begin{aligned}\text{VE 含量 } (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta A - 0.0065) \div 0.22 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \\ &= 9.09 \times (\Delta A - 0.0065) \div \text{细胞数量}\end{aligned}$$

4. 按照液体体积计算

$$\begin{aligned}\text{VE 含量 } (\mu\text{g/mL}) &= (\Delta A - 0.0065) \div 0.22 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \times 10 \\ &= 90.9 \times (\Delta A - 0.0065)\end{aligned}$$

V 反总：反应总体积，0.2mL；V 样：加入样本体积，0.1mL；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： $y = 0.11x + 0.0065$ $R^2 = 0.9978$

1. 按照蛋白含量计算

$$\begin{aligned}\text{VE 含量 } (\mu\text{g/mg prot}) &= (\Delta A - 0.0065) \div 0.11 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \\ &= 18.18 \times (\Delta A - 0.0065) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

$$\begin{aligned}\text{VE 含量 } (\mu\text{g/g}) &= (\Delta A - 0.0065) \div 0.11 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \\ &= 18.18 \times (\Delta A - 0.0065) \div W\end{aligned}$$

3. 按照细胞数量计算

$$\begin{aligned}\text{VE 含量 } (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta A - 0.0065) \div 0.11 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \\ &= 18.18 \times (\Delta A - 0.0065) \div \text{细胞数量}\end{aligned}$$

4. 按照液体体积计算

$$\begin{aligned}\text{VE 含量 } (\mu\text{g/mL}) &= (\Delta A - 0.0065) \div 0.11 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \times 10 \\ &= 181.8 \times (\Delta A - 0.0065)\end{aligned}$$

V 反总：反应总体积，0.2mL；V 样：加入样本体积，0.1mL；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

若反应体系产生沉淀，需要将样品进行适当的稀释，并在计算公式中乘以稀释倍数。