

总黄酮（Flavonoid）试剂盒说明书

(货号：ADS-F-KY007-48 分光法 48 样 有效期：6 个月)

一、指标介绍：

总黄酮，即黄酮类化合物；是植物重要的一类次生代谢产物，具有有较的抗氧化活性，可捕捉活性氧自由基，降低氧化伤害，在果实中影响其色泽和风味；对植物的抗逆性和抗病虫害方面有重要作用。

本试剂盒采用 NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - NaOH 显色法测定黄酮总含量，即在碱性亚硝酸盐溶液中，黄酮类化合物与铝离子形成在 510nm 处有特征吸收峰的红色络合物，测定反应产物在 510nm 处的吸光值，即可计算样品中总黄酮含量。

二、试剂盒组分与配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 4mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	液体 8mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 26mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、60%乙醇、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本制备：

① 组织样本：

称取约 0.1g 新鲜样本(若水分充足，可增加样本取样质量)；或者称取约 0.03g 烘干样本（将样本在 105℃下杀青 3min，然后 60℃烘干至恒重，粉碎，过 40-60 目筛，得到烘干样本），加入 1.5mL 的 60%乙醇（若鲜样需研磨均质），60℃振荡提取 2h（若蒸发用 60%乙醇定容至 1.5mL），25℃×12000rpm，离心 10min，取上清待测。

【注】：若样本量较少，可同比例缩减样本量，如取 0.02g 干样，加入 1mL60%乙醇，60℃振荡提取 2h。25℃×12000rpm，离心 10min，取上清，用 60%乙醇定容至 1mL 待测。

② 液体样本：直接检测；若浑浊，离心后取上清检测。

③ 细菌/培养细胞：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞至 EP 管中，加入 1mL 的 60%乙醇，60℃振荡提取 2h（若蒸发用 60%乙醇定容至 1mL），25℃×12000rpm，离心 10min，取上清待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为 500:1 比例进行提取。

2、检测步骤：

① 分光光度计预热 30min（等仪器过自检程序亦可），调节波长至 510nm，蒸馏水调零。

② 可先选取两个样本进行预测定，若 A 测定值超过 1.8，可对上清液或液体样本用 60%乙醇进行稀释，确定适合本批样本的稀释倍数 D，相应的稀释倍数 D 需代入公式计算。

③ 在 EP 管中依次加入：

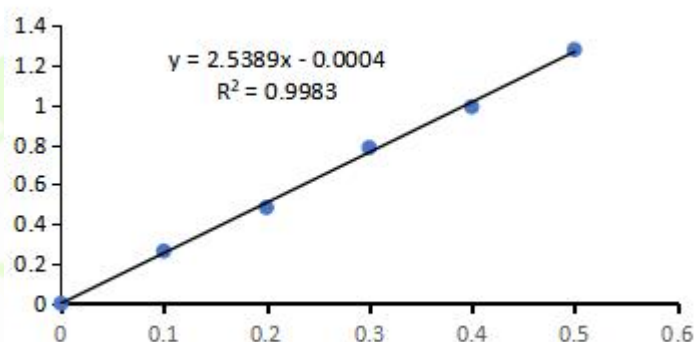
试剂名称 (μL)	测定管	空白管 (只做一次)
样本	200	
蒸馏水		200
试剂一	60	60
混匀，25℃静置 6min		
试剂二	120	120
混匀，25℃后静置 6min		
试剂三	420	420
混匀，25℃ 静置 15 min，液体全部转移至 1mL 玻璃比色皿中，510nm 处测定吸光值 A。ΔA=A 测定-A 空白。		

【注】：1. 若待检测样本有强背景色（如粉色，红色等），需做一个样本自身对照：即试剂二用 120μL 蒸馏水替换，其他步骤同测定管，ΔA=A 测定-A 对照。

2. 若ΔA 在零附近，可通过增加样本取样质量 W，则改变后的 W 代入公式计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程：y = 2.5389x - 0.0004，x 是标准品浓度 (mg/mL)，y 是ΔA。



2、按照样本重量计算：

$$\begin{aligned}\text{总黄酮含量(mg/g 重量)} &= [(\Delta A + 0.0004) \div 2.5389 \times V_1] \div (V_1 \div V \times W) \times D \\ &= 0.394 \times (\Delta A + 0.0004) \div W \times V \times D\end{aligned}$$

3、按照蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned}\text{总黄酮含量(mg/mg prot)} &= [(\Delta A + 0.0004) \div 2.5389 \times V_1] \div (V_1 \div V \times C_{pr}) \times D \\ &= 0.394 \times (\Delta A + 0.0004) \div C_{pr} \times V \times D\end{aligned}$$

4、按照液体体积计算：

$$\begin{aligned}\text{总黄酮含量(mg/mL)} &= [(\Delta A + 0.0004) \div 2.5389 \times V_1] \div V_1 \times D \\ &= 0.394 \times (\Delta A + 0.0004) \times D\end{aligned}$$

5、按照细菌/细胞计算：

$$\begin{aligned}\text{总黄酮含量(mg/10}^4\text{ cell)} &= [(\Delta A + 0.0004) \div 2.5389 \times V_1] \div (V_1 \div V \times 500) \times D \\ &= 0.394 \times (\Delta A + 0.0004) \div 500 \times V \times D\end{aligned}$$

V---提取液体积, 1.5mL; V1---反应中样品体积, 200 μ L=0.2ml;
W---样品质量, g; D---稀释倍数, 未稀释即为 1。
500---细菌或细胞总数, 万;
Cpr---上清液蛋白浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 标曲为非必做实验，用户可根据实验需求制作标曲，亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算。
- 2 制备标准品母液（1mg/mL）：称取 2mg 标准品至一新 EP 管，再加 2mL 的 60%乙醇提取液混匀溶解，即 1mg/mL 标准品，备用；
- 3 将母液用 60%乙醇稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 4 标品稀释参照表如下：

标品浓度 mg/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
标品母液 uL	0	80	160	240	320	400
60%乙醇 uL	400	320	240	160	80	0
各标准管混匀待用。						

- 5 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂组分 (μ L)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	200	
60%乙醇		200
试剂一	60	60
混匀, 25°C静置 6min		
试剂二	120	120
混匀, 25°C后静置 6min		
试剂三	420	420
混匀, 25°C 静置 15 min, 液体全部转移至 1mL 玻璃比色皿中, 510nm 处测定吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{\text{0 浓度}}$ 。		