

维生素 E (Vitamin E, VE) 试剂盒说明书

(货号: ADS-F-G014 分光法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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。

本试剂盒检测原理: 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。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	备注
提取液	液体 50mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 10mL×1 瓶	4°C 避光保存	
试剂二	液体 5mL×1 瓶	4°C 避光保存	
试剂三	液体 5mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂四	液体 30mL×1 瓶	4°C 保存	
标准品		自备	

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、无水乙醇、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)、漩涡震荡仪。

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、样本提取:

① 组织样本:

1. 按照质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.2g, 加入 1mL 提取液) 加入提取液, 充分匀浆后用提取液定至 2mL, 在漩涡混匀仪上震荡 5min, 于 25°C, 5000g 离心 10min, 取上层测定。

② 液体样本 (血清等): 取 0.2mL, 加 1.9mL 提取液, 漩涡仪混匀上震荡 5min, 于 25°C, 5000g 离心 10min, 取上层测定。

③ 细胞样本:

按照细胞数量 (10^4 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 1000 万细胞加入 2mL 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); 在漩涡混匀仪上震荡 5min, 于 25°C, 5000g 离心 10min, 取上层测定。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、检测步骤:

① 分光光度计预热 30 min (过自检程序亦可), 调节波长到 530nm。

② 在 EP 管中依次加入:

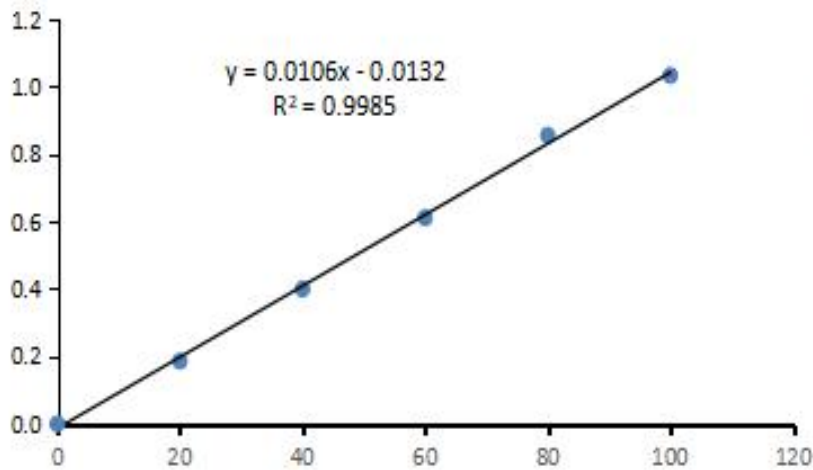
试剂组分 (μ L)	测定管	对照管
样本	500	500
试剂一	100	100
试剂二	100	

试剂三		100
充分混匀, 25°C反应 5min		
试剂四	300	300
充分混匀, 转移至 1mL 玻璃比色皿, 无水乙醇调零, 于 530nm 处读取各管吸光值, 记为 A 对照管和 A 测定管, $\Delta A = A_{测定管} - A_{对照管}$ 。		

【注】1.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。

五、结果计算:

1、标准曲线: $y = 0.0106x - 0.0132$: x 为维生素 E 标准品($\mu\text{g/mL}$), y 为 ΔA 。



2. 按照蛋白含量计算

$$\begin{aligned} \text{VE 含量 } (\mu\text{g}/\text{mg prot}) &= (\Delta A - 0.0065) \div 0.022 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \\ &= 181.8 \times (\Delta A - 0.0065) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3. 按照样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{VE 含量 } (\mu\text{g}/\text{g}) &= (\Delta A - 0.0065) \div 0.022 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \\ &= 181.8 \times (\Delta A - 0.0065) \div W \end{aligned}$$

4. 按照细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{VE 含量 } (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta A - 0.0065) \div 0.022 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \\ &= 181.8 \times (\Delta A - 0.0065) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

5. 按照液体体积计算

$$\begin{aligned} \text{VE 含量 } (\mu\text{g}/\text{mL}) &= (\Delta A - 0.0065) \div 0.022 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \times 20 \\ &= 1818 \times (\Delta A - 0.0065) \end{aligned}$$

V 反总: 反应总体积, 1mL;

V 样: 加入样本体积, 0.5mL;

V 样总: 加入提取液体积, 2mL;

Cpr: 蛋白浓度, mg/mL;

W: 样本质量, g

500---细胞数量, 万;

附: 标准曲线制作过程:

1 标曲为非必做实验, 标准品需自备, 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 2mg/mL (现配现用)。

将母液用提取液稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 20, 40, 60, 80, 100 μ g/ml。也可根据实际样本调整标准品浓度。

3 标品稀释参照表如下:

吸取标准品母液 50 μ L, 加入 0.95mL 提取液, 混匀得到 100 μ g/ml 的标品稀释液待用。						
标品浓度 ug/ml	0	20	40	60	80	100
标品稀释液 uL	0	160	320	480	640	800
水 uL	800	640	480	320	160	0
各标准管混匀待用。						

4 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。在 EP 管中依次加入:

试剂组分 (μ L)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	500	
蒸馏水		500
试剂一	100	100
试剂二	100	
试剂三		100
充分混匀, 25 $^{\circ}$ C 反应 5min		
试剂四	300	300
充分混匀, 转移至 1mL 玻璃比色皿, 无水乙醇调零, 于 530nm 处读取各管吸光值, 记为 A 对照管和 A 测定管, $\Delta A = A_{测定管} - A_{对照管}$ 。		