

维生素 E(VE)测定试剂盒说明书(精简版)

(货号: A008-1-1 比色法 50 管/48 样)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书, 预试后再进行批量实验, 否则由此导致的后果用户自行承担!

一、试剂组成及配制:

	试剂组成	包装规格	保存条件
试剂一	粉剂	粉剂×1 支	2~8℃避光
试剂一应用液的配制: 溶于 6.5mL 无水乙醇中, 避光保存, 此粉剂较难溶解, 需要提前 3~4 小时配制, 使用前一定要确定粉剂完全溶解。			
试剂二	粉剂	粉剂×1 支	2~8℃避光
试剂二贮备液配制: 溶于 25mL 无水乙醇配成贮备液避光保存。			
试剂二应用液配制: 取试剂二贮备液用无水乙醇 10 倍稀释, 应用液 2~8℃保存不可超过 2 天。			
试剂三	液体	5mL×1 瓶	2~8℃
试剂四	组成匀浆介质	100mL×1 瓶	2~8℃
试剂五	1mg/mL 标准贮备液	0.6mL×1 支	2~8℃
12µg/mL VE 标准应用液配制: 取 1mg/mL 的 VE 标准品贮备液 0.12mL 加无水乙醇定容至 10mL, 充分混匀即可。			

[注]: 2~8℃密封保存, 有效期 3 个月。

二、适用范围:

本试剂盒适用于检测动物血清(浆)、组织和植物等中 VE 的含量。

三、需要自备的试剂:

含 533nm 波长的分光光度计及 1cm 光径比色皿、正庚烷(分析纯)、37℃水浴锅、台式低速离心机、各种规格移液器、双蒸水、生理盐水(0.9%)或 PBS(0.1M)、涡旋混匀器、试管或离心管、蛋白测定试剂(组织样本用, 本公司有售)。

四、操作步骤:

(一)、血清(浆)中维生素 E 的测定:

1、血清(浆)正庚烷维生素 E 的抽提:

	空白管	标准管	测定管
血清(浆)(mL)			0.1
双蒸水(mL)	0.4	0.3	0.3
12µg/mL VE 标准品(mL)		0.1	
无水乙醇(mL)	0.6	0.6	0.6
漩涡混匀 20 秒(蛋白沉淀)			
正庚烷(mL)	1.2	1.2	1.2
旋涡混匀(充分抽提)1 分钟, 然后 4000 转/分, 离心 5~10 分钟, 取最上层 VE 抽提液显色			

[注]: 观察试管内液分为三层, 最上层为正庚烷维生素 E 抽提液, 第二层为水及无水乙醇, 最下层为蛋白沉淀物。

2、显色反应:

	空白管	标准管	测定管
VE 正庚烷抽提液(mL)	0.8	0.8	0.8
试剂一应用液(mL)	0.1	0.1	0.1
试剂二应用液(mL)	0.05	0.05	0.05
混匀, 立即记录时间, 室温准确静置 5 分钟			
试剂三(mL)	0.05	0.05	0.05
混匀(10 秒左右)			
无水乙醇(mL)	1	1	1
混匀, 静置 2 分钟后, 533nm 处, 1cm 光径比色皿, 无水乙醇调零, 测各管吸光度值			

3、计算公式:

$$\text{VE 含量} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N$$

(µg/mL)

C 标准: 标准品浓度, 12µg/mL;

N: 样本测试前稀释倍数。

(二)、组织中维生素 E 的测定:

1、样本前处理:

10%组织匀浆的制备: 准确称取组织重量, 按重量(g): 体积(mL)=1: 9 的比例加入试剂四组织匀浆介质, 冰水浴条件下匀浆, 2500 转/分离心 10 分, 取上清待测。

2、组织匀浆中正庚烷维生素 E 的抽提:

	空白管	标准管	测定管
10%匀浆上清液(mL)			0.4
双蒸水(mL)	0.7	0.6	0.3
12µg/mL VE 标准品(mL)		0.1	
无水乙醇(mL)	0.6	0.6	0.6
漩涡混匀 20 秒(蛋白沉淀)			
正庚烷(mL)	1.2	1.2	1.2
旋涡混匀(充分抽提)1 分钟, 然后 3000~4000 转/分, 离心 5~10 分钟, 取最上层 VE 抽提液显色			

[注]: 观察试管内液分为三层, 最上层为正庚烷维生素 E 抽提液, 第二层为水及无水乙醇, 最下层为蛋白沉淀物。

3、显色反应:

	空白管	标准管	测定管
VE 正庚烷抽提液(mL)	0.8	0.8	0.8
试剂一应用液(mL)	0.1	0.1	0.1
试剂二应用液(mL)	0.05	0.05	0.05
混匀, 立即记录时间, 室温准确静置 5 分钟			
试剂三(mL)	0.05	0.05	0.05
混匀(10 秒左右)			
无水乙醇(mL)	1	1	1
混匀, 静置 2 分钟后, 533nm 处, 1cm 光径比色皿, 无水乙醇调零, 测各管吸光度值			

4、计算公式:

$$\text{组织 VE 含量} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \frac{W}{V_{\text{样总}}}$$

(µg/g 鲜重)

C 标准: 标准品浓度, 3µg/mL(样本取样量为 0.4mL, 标准品取样量为 0.1mL, 相当于 4 倍稀释后取 0.4mL);

W: 组织鲜重, g;

V 样总: 加入的提取液总体积, mL。

五、测定意义:

维生素 E (VE) 是天然脂溶性抗氧化剂, 它存在细胞膜性结构中(细胞膜、线粒体、微粒体)以及脂肪细胞的脂滴和循环的脂蛋白中。

VE 不但是单线态氧和超氧阴离子自由基的清除剂, 更重要的是脂质过氧化作用的阻断剂。从细胞水平的许多实验说明维生素 E 和 SoGSHPX 协同地保护细胞免受脂质过氧化损伤。VE 尚能直接与蛋白硫自由基偶联, 使蛋白巯基恢复活性, VE 也可通过清除 LOO 间接地防止蛋白巯基丧失。而蛋白巯基是维护细胞生存的重要环节, 因而 VE 是机体抗氧化的第一道防线。当维生素 E 缺乏时, 机体易受到自由基的攻击而表现出各种病理状态。例如: 老年性白内障、早衰等。

六、测定原理:

VE 在菲罗琳的存在下, 可使三价铁离子还原成二价铁离子, 后者在特定的环境下可与菲罗琳形成粉红色复合物, 通过比色, 在标准曲线上可查出 VE 的含量, 或者通过公式可计算出 VE 的含量。

七、注意事项:

- 1、试管要用肥皂粉或洗涤净煮开刷洗, 再用自来水冲洗干净后双蒸水冲洗一遍。
- 2、2 号试剂应用液最好当天配制, 需多少配多少。
- 3、显色时间 5 分钟, 要准确。
- 4、维生素 E 的抽提时间 1 分钟要充分。
- 5、因本法为微量测定, 故每换一次移液尖, 首次吸液要丢弃,

以后每次加样或加试剂均要垂直滴入，切勿加在管壁上。

- 6、吸取正庚烷抽提液时，一定要小心吸取，不可将第二层（即水与无水乙醇液相层）混入，否则会影响吸光值。
- 7、显色所用试管要干燥。
- 8、测定时注意密封，特别是混匀抽提时，要注意不要使液体溅出。
- 9、本试剂盒仅用于科研、实验室。