

原花青素（Proantho Cyanidins, PC）试剂盒说明书

（货号：BP10058F 分光法 24 样 有效期：6 个月）

一、指标介绍：

原花青素（Proantho Cyanidins, PC）广泛存在于植物的果实、种子、花和皮中的一种黄酮类化合物，具有极强的抗氧化性、清除自由基能力。最简单的原花青素是儿茶素、或表儿茶素、或儿茶素与表儿茶素形成的二聚体本。本试剂盒提供一种灵敏度更高的检测方法：硫酸-香草醛法；即在硫酸提供的酸性条件下，植物原花青素 A 环上的间苯二酚和间苯三酚与香草醛发生缩合反应，产生有色化合物，在 500nm 处有特征吸收峰，测定 500nm 光吸收值可计算原花青素的含量。

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
提取液	60%乙醇×60mL（自备）	4℃保存	1. 乙醇（mL）：水（mL）=36:24
试剂一	30%硫酸×25mL（自备）	4℃保存	1. 甲醇（mL）：硫酸（mL）=17.5:7.5；先加入甲醇，后缓缓加入硫酸。
试剂二	粉剂 1 瓶	4℃避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 12mL 甲醇溶解； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
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、无水乙醇、硫酸、甲醇/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、样本提取：

① 组织样本：

称约 0.1g 样本（水分充足的样本可取 0.5g），加入 2mL 提取液，冰浴匀浆，用超声提取法进行提取，超声功率 300W，提取 30min，12000rpm，25℃离心 10min，取上清，用提取液定容至 2mL 待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例进行提取

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 2mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4℃

离心 10min，取上清，置冰上待测。

【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：

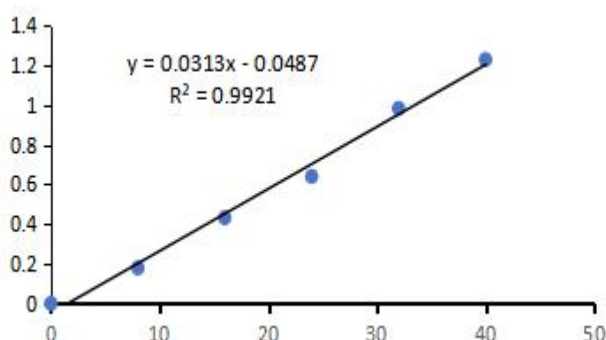
- ① 分光光度计预热 30min（等待仪器过自检程序亦可），调节波长至 500nm，蒸馏水调零。
- ② 在 EP 管中按照下表依次加入试剂：

试剂组分（μL）	测定管	对照管
样本	80	80
试剂一	400	400
甲醇		400
试剂二	400	
混匀，放在 30℃ 恒温培养箱孵育 20min 后，液体全部转移至 1mL 玻璃比色皿中，于 500nm 读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本做一个自身对照）。		

【注】1. A 值正常范围在 0.01-0.6 之间。否则加大样品取样质量 W 或增加 V1（如增至 160μL，则试剂一相应减少，保持总体积不变）或用提取液稀释样品，则改变后的 W、V1 和稀释倍数 D 代入公式计算。

五、结果计算：

- 1、标准曲线： $y = 0.0313x - 0.0487$ ；x 是标准品质量：μg，y 是 ΔA 。



- 2、原花青素含量(mg/g 鲜重)=[$(\Delta A + 0.0487) \div 0.0313$] $\div (V1 \div V \times W) \times 10^{-3} \times D$
 $= 0.8 \times (\Delta A + 0.0487) \div W \times D$
- 3、原花青素含量(mg/mg prot)=[$(\Delta A + 0.0487) \div 0.0313$] $\div (V1 \div V \times Cpr) \times 10^{-3} \times D$
 $= 0.8 \times (\Delta A + 0.0487) \div Cpr \times D$
- 4、原花青素含量(mg/ml)=[$(\Delta A + 0.0487) \div 0.0313$] $\div (V1 \div V) \times 10^{-3} \times D$
 $= 0.8 \times (\Delta A + 0.0487) \times D$
- 5、原花青素含量(mg/ 10^4 cell)=[$(\Delta A + 0.0487) \div 0.0313$] $\div (V1 \div V \times 500) \times 10^{-3} \times D$
 $= 0.0015 \times (\Delta A + 0.0487) \times D$

V---加入提取液体积，2mL； V1---反应中样品体积，0.08mL；

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）：向标准品 EP 管里面加入 1mL 提取液（母液需在两天内用且-20℃保存）；
3. 把母液用提取液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5mg/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：

吸取标准品母液 1ml，加入 1ml 提取液，混匀得到 0.5mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
标品稀释液 uL	0	80	160	240	320	400
提取液 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 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	80	80
提取液		
试剂一	400	400
试剂二	400	400
混匀，放在 30℃恒温培养箱孵育 20min 后，液体全部转移至 1mL 玻璃比色皿中，于 500nm 读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{标品}} - A_0$ 浓度。		