

原花青素（Proantho Cyanidins, PC）试剂盒说明书

（货号：BP10058W 微板法 48 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。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×100mL（自备）	4℃保存	1. 乙醇（mL）：水（mL）=60:40
试剂一	30%硫酸×15mL（自备）	4℃保存	1. 甲醇（mL）：硫酸（mL）=10.5:4.5（先加甲醇，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 6mL 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）、96 孔板、离心管、酶标仪、**甲醇**、无水**乙醇**、**硫酸**、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 酶标仪预热 30min（等待仪器过自检程序亦可），调节波长至 500nm。

② 在 96 孔板中按照下表依次加入试剂：

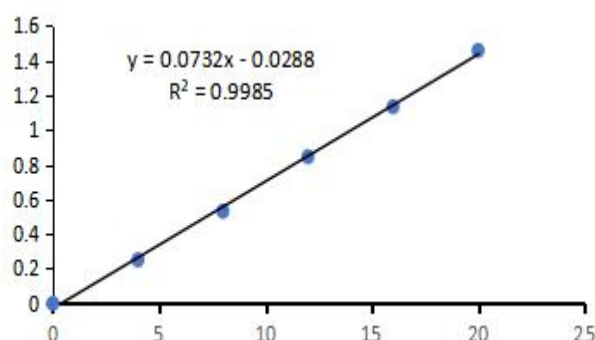
试剂组分（ μL ）	测定管	对照管
样本	20	20
试剂一	100	100
甲醇		100
试剂二	100	
混匀，放在 30℃ 恒温培养箱孵育 20min 后，在 500nm 处测定， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本做一个自身对照）。		

【注】1. 96 孔板盖上盖子或者缠上保鲜膜或者锡纸（防止水份散失）。

2. 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 160 μL ，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： $y = 0.0732x - 0.0288$ ，x 是标准品质量： μg ，y 是 ΔA 。



2、原花青素含量(mg/g 鲜重)=[$(\Delta A + 0.0288) \div 0.0732$] $\div (V1 \div V \times W) \times 10^{-3} \times D$

$$= 1.366 \times (\Delta A + 0.0288) \div W \times D$$

3、原花青素含量(mg/mg prot)=[$(\Delta A + 0.0288) \div 0.0732$] $\div (V1 \div V \times C_{\text{pr}}) \times 10^{-3} \times D$

$$= 1.366 \times (\Delta A + 0.0288) \div C_{\text{pr}} \times D$$

4、原花青素含量(mg/ml)=[$(\Delta A + 0.0288) \div 0.0732$] $\div V1 \times 10^{-3} \times D$

$$= 1.366 \times (\Delta A + 0.0288) \times D$$

5、原花青素含量(mg/ 10^4 cell)=[$(\Delta A + 0.0288) \div 0.0732$] $\div (V1 \div V \times 500) \times 10^{-3} \times D$

$$= 0.0027 \times (\Delta A + 0.0288) \times D$$

V---加入提取液体积，2mL；

V1---反应中样品体积，0.02mL；

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, 0.2, 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	1.0
标品母液 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	20	
提取液		20
试剂一	100	100
试剂二	100	100
混匀，放在 30℃恒温培养箱孵育 20min 后，在 500nm 处测定， $\Delta A = A_{\text{标品}} - A_0$ 浓度。		