

总花青素（总花色苷）含量试剂盒说明书

(货号: BP10066W 微板法 96 样 保质期: 6 个月)

一、指标介绍:

花青素是一种广泛存在于自然界植物中的水溶性天然色素,但是在自然状态下常与各种单糖形成糖苷形式存在,即**花色苷**。它是植物细胞中可见的植物水溶性色素,存在于几乎所有的陆地植物的根、茎、叶、花及果实中;且还具有较强的抗氧化活性,能够清除自由基。

本试剂盒采用 PH 示差法,花色苷的颜色随 PH 值的改变而发生变化,而干扰物质的特征光谱不随 PH 的改变而变化。pH 为 1 时,花色苷以红色的 2-苯基苯并吡喃的形式存在。pH 为 4.5 时,花色苷以无色的甲醇假碱形式存在,通过确定两个对花色苷吸光度差别最大,但是对花色苷稳定的 pH 值(一般选 pH 值为 1.0 和 4.5),花色苷溶液的吸光度差值与花色苷的含量成比例,进而计算得出花色苷总量。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度
提取液	液体 110mL×1 瓶	4℃避光保存
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4℃避光保存
试剂二	液体 30mL×1 瓶	4℃避光保存

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、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 0.05g 样品(水分充足的样本,可取样 0.5g),加入 1mL 提取液,75℃震荡提取 25min,若提取过程中提取液有损失,最后可用提取液定容至 1mL 后,室温 12000rpm,离心 10 min,上清液待测。

【注】:若是固体干样本,先磨碎并过 40 目筛后,取 0.02g 的过筛后干样,加入 1 mL 提取液,其他步骤同上。最后离心得到的上清液待测。

② 液体样本:

澄清的液体的样本直接测定,若浑浊则离心后取上清液检测。

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 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,75℃震荡提取 25min,若提取过程中提取液有损失,最后可用提取液定容至 1mL 后,室温 12000rpm,离心 10 min,上清液待测。

置冰上待测。

2、检测步骤

① 酶标仪预热 30min 以上(等仪器过自检程序亦可),对于含量较高的样本,可先选取 2 个样本做预测定,找出适合本次检测样本的稀释倍数 D(用提取液进行稀释即可)。

② 在 EP 管中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
上清液	100	100
试剂一	300	
试剂二		300
室温避光平衡 60min，分别取 200μL 澄清液体（若浑浊可 12000rpm 室温离心 5min）至 96 孔板中，于 530nm 和 700nm 处读值。测定管记作 $A_{\text{测定}}=A_{530}-A_{700}$ ；对照管记作 $A_{\text{对照}}=A_{530}-A_{700}$ ； $\Delta A=A_{\text{测定}}-A_{\text{对照}}$ （每个样本需做一个自身对照）。		

【注】：1.若A测定管于530nm处的值大于1.5，则上清液可用提取液进行稀释，稀释后的上清液再按照上述加样表操作。稀释倍数D需代入计算公式计算。

2.若ΔA值小于0.01，可增加样本取样质量W,则改变后的W需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按照样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{总花青素含量(mg/g)} &= (\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^3 \times Mr) \div (W \times V_1 \div V) \times D \\ &= 0.1336 \times \Delta A \div W \times D \end{aligned}$$

2、按照蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{原花青素含量(mg/mg prot)} &= (\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^3 \times Mr) \div (C_{pr} \times V_1 \div V) \times D \\ &= 0.1336 \times \Delta A \div C_{pr} \times D \end{aligned}$$

3、按照样本浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{总花青素浓度(mg/mL)} &= (\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^3 \times Mr) \div V_1 \times D \\ &= 0.1336 \times \Delta A \times D \end{aligned}$$

4、按细菌或细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{总花青素含量(mg/10}^4 \text{ cell)} &= (\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^3 \times Mr) \div (500 \times V_1 \div V) \times D \\ &= 0.1336 \times \Delta A \div 500 \times D \end{aligned}$$

ϵ ---为矢车菊-3-葡萄糖苷消光系数，26900 L/mol/cm；

Mr---为矢车菊素-3-葡萄糖苷分子量，449.2；

d---光程，0.5 cm；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

V---样本提取液，1mL；

W---样本重量，g；

V1---检测操作表里上清液加样体积，100μL=0.1mL；

V2---检测总体积，400μL=4×10⁻⁴L； 500---细菌或细胞总数，万；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。