

异黄酮含量检测试剂盒说明书

(货号: BP10467F 紫外法 96 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

大豆异黄酮是黄酮类化合物, 是大豆生长中形成的一类次级代谢产物, 是一种生物活性物质。由于是从植物中提取, 与雌激素有相似结构, 因此大豆异黄酮又称植物雌激素。大豆异黄酮的雌激素作用影响到激素分泌、代谢生物学活性、蛋白质合成、生长因子活性, 是天然的癌症化学预防剂。

本实验采用 95%乙醇进行提取, 利用染料木素作为标品, 进行紫外 260nm 进行检测吸光值, 采用单波长法进行含量计算。

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	自备	4°C保存	1. 配制提取液(95%乙醇): 2. 取 95mL 无水乙醇加 5ml 蒸馏水充分混匀, 作为提取液
标准品	粉剂 1 支	4°C避光保存	1. 临用前 8000g 4°C 离 2min 使试剂落入管底; 2. 加 1ml 95%乙醇溶解; 3. 溶解后的标品母液浓度为 1mg/ml。

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(UV 板)、离心管、紫外分光光度计、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)、无水乙醇。

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、样本制备

① 组织样本: 称取 0.1g 样本, 加入 1.5mL 提取液进行匀浆, 于 4°C 浸提 24h, 12000rpm, 4°C 离心 10min, 取上清待测。

【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 细菌/细胞样本: 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°C 离心 10min, 取上清待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量(10⁴): 提取液(mL)为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

2、标准溶液的配制

1 标准品母液浓度为 1000mg/L。将母液用提取液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0、5、10、15、20、25mg/L;

2 标品稀释参照表如下:

吸取标准品母液 100uL, 加入 3.9ml 提取液, 混匀得到 25mg/L 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/L	0	5	10	15	20	25
标品稀释液 uL	0	240	480	720	960	1200

提取液 uL	1200	960	720	480	240	0
各标准管混匀，分光光度计调零后，吸取 1ml 至石英比色皿中，于 260nm 处读取吸光值，以 ΔA 过 0 点绘制标准曲线， $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_0$ 。						

3、上机操作

①打开紫外分光光度计预热 30min（等待仪器过自检程序亦可），设定波长到 260nm，蒸馏水调零。

②操作表：

试剂名称(μL)	测定管	标准管	空白管
样本	1000	-	-
标准溶液	-	1000	-
提取液	-	-	1000
测定 260nm 处的吸光值 A，分别记为 A 测定、A 标准、A 空白。 计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。 (注：空白管只需测定 1-2 次)			

注意：

① ΔA 最佳范围为 0.01~1.5，用户可根据样本情况调整检测浓度；

②若预实验测定吸光值超出标准吸光值线性范围，高于最高值建议将待测样本用提取液适当稀释后再进行测定，低于最低值建议适当增加样本质量 W 后再进行测定，并将改变后的 W 和 D 代入公式计算；

③标准管和空白管预实验已做，正式实验可延用。

五、结果计算：

1、以各个标准溶液的浓度为 x 轴，其对应的 $\Delta A_{\text{标准}}$ 为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y = kx + b$ ，将 $\Delta A_{\text{测定}}$ 带入方程得到 x (mg/L)。

2、异黄酮含量(mg/g 质量) = $x \times V \div W \times D = 0.0015 \times x \div W \times D$

3、异黄酮含量(mg/L) = $x \times V \times D = 0.0015 \times x \times D$

4、异黄酮含量(mg/mgprot) = $x \times V \div Cpr \times D = 0.0015 \times x \div Cpr \times D$

5、异黄酮含量(mg/10⁴cell) = $x \times V \div 500 \times D = 0.001 \times x \div 500 \times D$

V：加入提取液体积，1.5mL=0.0015L；W：样品质量，g；

V：细胞样本加入提取液体积，1mL=0.001L500---细菌或细胞总数，万

D：稀释倍数，未稀释即为 1。

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