

异黄酮含量检测试剂盒说明书

(货号：ADS-W-KY012-96 微板法 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℃保存	配制提取液（95%乙醇）： 1. 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℃避光保存	1. 临用前 8000g 4℃ 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、酶标仪、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℃ 浸提 24h，12000rpm，4℃ 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℃ 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

- 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；
- 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	60	120	180	240	300

提取液 uL	300	240	180	120	60	0
各标准管混匀，吸取 200uL 至 96 孔 UV 板中，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酶标仪预热 30min 以上（等待仪器过自检程序亦可），调节波长至 260nm。

②操作表：

试剂名称(μL)	测定管	标准管	空白管
样本	200	-	-
标准溶液	-	200	-
提取液	-	-	200
测定 260nm 处的吸光值 A，分别记为 A 测定、A 标准、A 空白。 计算 ΔA 测定 = A 测定 - A 空白， ΔA 标准 = A 标准 - A 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 ΔA 标准为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y = kx + b$ ，将 ΔA 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/ 10^4 cell) = $x \times V \div 500 \times D = 0.001 \times x \div 500 \times D$

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=0.001L 500---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