

原花青素 (Proantho Cyanidins, PC) 试剂盒说明书

(货号: ADS-W-KY009-48 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：

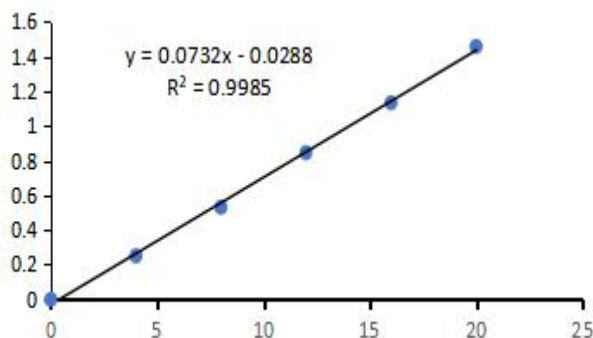
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	20	20
试剂一	100	100
甲醇		100
试剂二	100	
混匀，放在 30℃ 恒温培养箱孵育 20min 后，在 500nm 处测定， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本做一个自身对照)。		

【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 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： $y = 0.0732x - 0.0288$ ，x 是标准品质量：μg，y 是 ΔA 。



$$2、\text{原花青素含量(mg/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0288) \div 0.0732] \div (V1 \div V \times W) \times 10^{-3} \times D \\ = 1.366 \times (\Delta A + 0.0288) \div W \times D$$

$$3、\text{原花青素含量(mg/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0288) \div 0.0732] \div (V1 \div V \times Cpr) \times 10^{-3} \times D \\ = 1.366 \times (\Delta A + 0.0288) \div Cpr \times D$$

$$4、\text{原花青素含量(mg/ml)} = [(\Delta A + 0.0288) \div 0.0732] \div V1 \times 10^{-3} \times D \\ = 1.366 \times (\Delta A + 0.0288) \times D$$

$$5、\text{原花青素含量(mg/10}^4\text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0288) \div 0.0732] \div (V1 \div V \times 500) \times 10^{-3} \times D \\ = 0.0027 \times (\Delta A + 0.0288) \times D$$

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。		