

总花青素（总花色苷）含量试剂盒说明书

（货号：ADS-W-KY016-96 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：

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

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。