

还原型抗坏血酸 (ascorbic acid, AsA) 含量测定试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

AsA 又称维生素 c。AsA 是辅酶、自由基清除剂、电子共体/受体和草酸盐与酒石酸盐生物合成的底物等。作为植物细胞中最重要的抗氧化剂，AsA 在保护叶绿体免于氧化损伤起着举足轻重的作用，也是衡量农作物产品品质的重要指标之一。

测定原理：

抗坏血酸氧化酶 (AAO) 催化 AsA 氧化生成 DHA，通过测定 AsA 的氧化速率，即可计算出 AsA 含量。

自备仪器和用品：

研钵、冰、低温离心机、紫外分光光度计、1mL 石英比色皿、可调式移液器和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：液体 10 μL×2 瓶，4℃ 保存。临用前加入 2.5mL 试剂二，混匀。

标准品：粉剂×1 瓶（棕色），4℃ 保存。临用前配制，加入 5.679 mL 蒸馏水充分溶解；吸取 0.1 mL 上述溶液，加入 0.9 mL 蒸馏水，混匀，即 100μmol/L AsA。

样品中 AsA 提取：

1. 组织：按照组织质量 (g)：试剂一体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一）进行冰浴匀浆。8000g，4℃ 离心 20min，取上清置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量 (10⁴ 个)：试剂一体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；8000g，4℃ 离心 20min，取上清液置冰上混匀待测。
3. 血清等液体：直接测定。

AsA 测定操作：

1. 分光光度计预热 30 min，调节波长到 265 nm，蒸馏水调零。
2. 试剂二在 25℃ 水浴锅中预热 30 min。
3. 标准管：依次在比色皿中加入 100μL 标准液、800μL 试剂二和 100μL 试剂三，迅速混匀，在 265nm 测定，记录 30s 和 150s 的吸光值 A1 和 A2， ΔA 标准管= A1 - A2。
4. 测定管：依次在比色皿中加入 100μL 上清液、800μL 试剂二和 100μL 试剂三，迅速混匀，在 265nm 测定，记录 30 s 和 150s 的吸光值 A3 和 A4， ΔA 测定管= A3 - A4。

注意：标准管只需测定一次。

AsA 含量计算公式：

(1). 按蛋白浓度计算

$$\text{AsA (nmol/mg prot)} = [\text{C 标准液} \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \times \text{V 标准}] \div (\text{Cpr} \times \text{V 样}) = 100 \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \div \text{Cpr}$$

(2). 按样本质量计算

$$\text{AsA (nmol/g 鲜重)} = [\text{C 标准液} \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \times \text{V 标准}] \div (\text{W} \times \text{V 样} \div \text{V 样总}) = 100 \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \div \text{W}$$

(3). 按细胞数量计算

$$\text{AsA (nmol/10}^4 \text{ cell)} = [\text{C 标准液} \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \times \text{V 标准}] \div (\text{细胞数量} \times \text{V 样} \div \text{V 样总})$$

$$=100 \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

$$\begin{aligned} \text{AsA (nmol/mL)} &= [\text{C 标准液} \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \times \text{V 标准}] \div \text{V 样} \\ &= 100 \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \end{aligned}$$

C 标准液: 100 μ mol/L; V 标准: 标准液体积, 0.1mL; V 样总: 上清液总体积, 1.0 mL=0.001 L; V 样: 加入反应体系中上清液体积, 0.1mL; Cpr: 蛋白含量, mg/mL; W: 样品质量, g。

注意事项:

1. 试剂三和标准品现配现用, 配制好的 4 $^{\circ}$ C 保存, 3 天内使用完。
2. 最低检出限为 10 μ mol/L。

订购电话: 4008-898-798 技术支持: 13818158258