

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

微量法 100T/96S

**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/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板（UV 板）、可调式移液器和蒸馏水。

### 试剂组成和配制：

试剂一：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 20mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：液体 5 μL×2 瓶，4℃ 保存。临用前加入 1.25 mL 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 100 μmol/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（ $10^4$  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/酶标仪预热 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：**依次在微量石英比色皿/96 孔板中加入 20μL 标准液、160μL 试剂二和 20μL 试剂三，迅速混匀，在 265nm 测定，记录 30s 和 150s 的吸光值 A1 和 A2， $\Delta A$  标准管= A1 - A2。
4. **测定管：**依次在微量石英比色皿/96 孔板中加入 20μL 上清液、160μL 试剂二和 20μL 试剂三，迅速混匀，在 265nm 测定，记录 30s 和 150s 的吸光值 A3 和 A4， $\Delta A$  测定管= A3 - A4。

**注意：**标准管只需测定一次。

### AsA 含量计算公式：

a.使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1). 按蛋白浓度计算

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

(2). 按样本质量计算

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

(3). 按细胞数量计算

$$\text{AsA}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = [\text{C 标准液} \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \times V \text{ 标准}] \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \\ = 100 \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

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

C 标准液: 100 $\mu\text{mol/L}$ ; V 样总: 上清液总体积, 1.0 mL=1  $\times 10^{-3}$  L; Cpr: 上清液蛋白质浓度, mg/mL; W: 样品质量 (g)。

b.使用 96 孔板测定的计算公式如下

((1). 按蛋白浓度计算

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

(2). 按样本质量计算

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

(3). 按细胞数量计算

$$\text{AsA}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = [\text{C 标准液} \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \times V \text{ 标准}] \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \\ = 100 \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

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

C 标准液: 100 $\mu\text{mol/L}$ ; V 样总: 上清液总体积, 1.0 mL=1  $\times 10^{-3}$  L; Cpr: 上清液蛋白质浓度, 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 $^{\circ}\text{C}$  保存, 3 天内使用完。
2. 最低检出限为 10  $\mu\text{mol/L}$ 。

---

订购电话: 4008-898-798      技术支持: 13818158258

