

还原型抗坏血酸 (AsA) 含量测定试剂盒说明书

(微板法 96 样)

一、产品简介:

抗坏血酸 AsA 又称维生素 C。是一种重要的抗氧化剂,在氧化还原代谢反应中起调节作用,抗坏血酸 (AsA) 与脱氢抗坏血酸 (DHA) 的比值 (AsA/ DHA) 是反映细胞氧化状态的另一个重要指标。

还原型抗坏血酸 (AsA) 把三价铁离子还原成二价铁离子,二价铁离子与红菲咯啉反应生成红色络合物,在 534nm 处有特征吸收峰,颜色深浅与还原型抗坏血酸含量成正比。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	A: 液体 0.2mL×1 支 试剂瓶 B(空瓶)	4°C保存	试剂二 B 液配制: 临用前取出 0.047mLA 液至试剂瓶 B 中, 再加 9.953mL 无水乙醇, 混匀备用。
试剂三	粉体 mg×1 瓶	4°C保存	用前甩几下使粉体落入底部, 再加 13mL 无水乙醇混匀溶解(该试剂难溶, 可超声溶解)。
试剂四	液体 5mL×1 瓶	4°C保存	溶液为淡黄色。
标准品	粉剂×2 支	4°C保存	临用前: 每支用前甩几下标准品管, 使粉剂落入底部, 再加入 1mL 试剂一混匀溶解, 即得 5mg/mL, 再用试剂一稀释 500 倍 (1:499) 为 0.01mg/mL 溶液即为 标准液(现配现用) 。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、研钵、冰、低温离心机、无水乙醇、可调式移液器和蒸馏水。

四、还原型抗坏血酸 (AsA) 含量测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织(水分充足的果实样本取约 0.5g 组织或更多), 加入 1mL 预先预冷的提取液, 进行冰浴匀浆, 室温静提 10min 后, 12000rpm, 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本, 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/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 在 4°C 或冰浴进行匀浆(使用各类常见电动匀浆器或超声破碎)。4°C 约 12,000rpm 离心 10min, 取上清作为待测样品。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量(10^4):提取液(mL)为 500~1000:1 的比例进行提取。

2、上机检测：

- ① 酶标仪预热 30 min，调节波长到 534nm。
- ② 叶片类样本直接检测即可，果肉类样本一般需先稀释 10 倍再检测（可按照加样表操作时加入 20 μ L 样本，试剂一增加为 280 μ L）
- ③ 依次在 EP 管中依次加入：

试剂名称 (μ L)	测定管	标准管 (仅做一次)	空白管 (仅做一次)
样本	200		
标准液		200	
提取液			200
试剂一	100	100	100
无水乙醇	100	100	100
试剂二 B 液	50	50	50
试剂三	100	100	100
试剂四	50	50	50

混匀，于 30 $^{\circ}$ C 反应 60min 后，立即取出 200 μ L 澄清液体（若有沉淀需 8000rpm，室温离心 5min，取上清液）至 96 孔板中，立即于 534nm 处读取各管吸光值 A。

- 【注】 1.若提取完的样本上清液有较强的背景色（如粉色，红色等），需增设一个样本自身对照：即对照管为 200 μ L 样本+100 μ L 试剂一+50 μ L 试剂二 B 液+250 μ L 无水乙醇，30 $^{\circ}$ C 反应 60min 后，剩余步骤同测定管， $\Delta A = A_{测定} - A_{对照} - A_{空白}$ 。
- 2.若测定管大于 0.8，可对样本进行稀释 D，或降低样本量则试剂一相应增加。则稀释倍数 D 或改变后的样本体积 V1 需代入公式重新计算。
- 3.若 A 测定-A 空白的差值小于 0.01，可增加样本加样量 V1（如增至 0.3mL，则试剂一减至 0mL；或增至 0.4mL，则试剂一和无水乙醇均减至 0mL），或增加样本取样质量 W（如由 0.1g 增至 0.2g 或更多）。则改变后的 V1 和 W 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本质量计算：

$$AsA(\text{mg/g 鲜重}) = [(A_{测定} - A_{空白}) \div (A_{标准} - A_{空白})] \times (C_{标准} \times V_{标准}) \div (W \times V1 \div V) \times D \\ = 0.01 \times (A_{测定} - A_{空白}) \div (A_{标准} - A_{空白}) \div W \times D$$

2、按液体体积计算：

$$AsA(\text{mg/mL}) = [(A_{测定} - A_{空白}) \div (A_{标准} - A_{空白})] \times (C_{标准} \times V_{标准}) \div V1 \times D \\ = 0.01 \times (A_{测定} - A_{空白}) \div (A_{标准} - A_{空白}) \times D$$

3、按细菌/细胞数量计算：

$$AsA(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [(A_{测定} - A_{空白}) \div (A_{标准} - A_{空白})] \times (C_{标准} \times V_{标准}) \times 10^3 \div (500 \times V1 \div V) \times D \\ = 10 \times (A_{测定} - A_{空白}) \div (A_{标准} - A_{空白}) \div 500 \times D$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入反应体系中上清液体积，0.2mL；

V 标准---加入标准液体积，0.2mL；

C 标准---标准液浓度，0.01mg/mL；

W---样品质量（g）；

D---稀释倍数，若没有稀释即为 1。

500---细胞数量，万。