

抗坏血酸/总抗坏血酸 (AsA/T-AsA) 含量检测试剂盒 (比色法) 说明书

可见分光光度法

货号: AC10726

规格: 50T/24S

产品内容: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 40 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂二	液体 20 mL×1 瓶	4°C保存
试剂三	液体 3 mL×1 瓶	4°C保存
试剂四	液体 30 mL×1 瓶	4°C保存
试剂五	液体 20 mL×1 瓶	4°C保存
试剂六	粉剂×1 瓶	4°C保存
试剂七	液体 12 mL×1 瓶	4°C保存
标准品	粉剂×1 支	4°C保存

溶液的配制:

- 1、试剂一: 临用前加入 3.3 mL 蒸馏水充分溶解待用, 用不完的试剂-20°C分装避光保存。
- 2、试剂六: 临用前加入 12 mL 70%乙醇 (V/V) 溶液溶解。
- 3、标准品: 临用前配制, 加入 1.136mL 提取液充分溶解; 吸取 0.01 mL 上述溶液, 加入 0.99 mL 提取液, 混匀, 即 500 nmol/mL AsA 标准溶液。

产品说明:

抗坏血酸 (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。脱氢抗坏血酸 (DHA) 是 AsA 的可逆的氧化型, 在生物体内, 与抗坏血酸共同组成氧化还原系统, 具有电子受体作用。

AsA 具有还原性, 能将 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} , Fe^{2+} 与 2,2'-联吡啶形成粉红色络合物, 在 525nm 处有特征性吸收峰。DTT 可还原 DHA 生成 AsA, 可用于检测样本总抗坏血酸 (AsA+DHA) 含量。

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

研钵/匀浆器、冰、低温离心机、可见分光光度计、1 mL 玻璃比色皿、可调式移液器、乙醇和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

1. 组织: 按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1 g 组织, 加入 1 mL 提取液) 进行冰浴匀浆。13000g, 4°C离心 10 min, 取上清置冰上待测。

2. 细胞或细菌：按照细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为 500~1000 : 1 的比例（建议 500 万细胞加入 1 mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300 W，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3 min），13000g，4℃离心 10 min，取上清液置冰上混匀待测。

3. 血清等液体：取 500 μ L 样本，加入 500 μ L 提取液，漩涡混匀。13000g，4℃离心 10 min，取上清置冰上待测。

二、测定步骤

1. 分光光度计预热 30 min，调节波长到 525 nm，蒸馏水调零。

2. AsA 含量测定

AsA 含量测定操作表，按照操作表加入下列试剂：

试剂名称 (μ L)	测定管	对照管	空白管 1	空白管 2	标准管
样本	50	50	-	-	-
提取液	-	-	50	50	-
标准溶液	-	-	-	-	50
试剂二	200	200	200	200	200
试剂四	250	250	250	250	250
试剂五	200	200	200	200	200
试剂六	200	-	200	-	200
70%乙醇溶液	-	200	-	200	-
试剂七	100	100	100	100	100

混匀，42℃水浴准确反应 40 min，冷水冷却，于 525 nm 处测定吸光值，分别记为 A 测定管、A 对照管、A 空白管 1、A 空白管 2 及 A 标准管。计算 ΔA_1 测定管= (A 测定管-A 对照管)-(A 空白管 1-A 空白管 2)、 ΔA_1 标准管=A 标准管-A 空白管 1。

注意：加入试剂七时将枪头伸入液面以下加入，不可悬空滴加，否则会导致液体浑浊。空白管 1、空白管 2 及标准管只需测定 1-2 次。

3. T-AsA 含量测定

T-AsA 含量测定操作表，按照操作表加入下列试剂：

试剂名称 (μ L)	测定管	对照管	空白管 1	空白管 2	标准管
样本	50	50	-	-	-
提取液	-	-	50	50	-
标准溶液	-	-	-	-	50
试剂一	50	50	50	50	50
试剂二	100	100	100	100	100
混匀，42℃水浴反应 15 min。					
试剂三	50	50	50	50	50
混匀，室温静置 1 min。					
试剂四	250	250	250	250	250
试剂五	200	200	200	200	200

试剂六	200	-	200	-	200
70%乙醇溶液	-	200	-	200	-
试剂七	100	100	100	100	100
混匀，42°C水浴准确反应 40 min，冷水冷却，于 525 nm 处测定吸光值，分别记为 A 测定管、A 对照管、A 空白管 1、A 空白管 2 及 A 标准管。计算 ΔA_2 测定管=(A 测定管-A 对照管)-(A 空白管 1-A 空白管 2)、 ΔA_2 标准管=A 标准管-A 空白管 1。					

注意：加入试剂七时将枪头伸入液面以下加入，不可悬空滴加，否则会导致液体浑浊。空白管 1、空白管 2 及标准管只需测定 1-2 次。

三、AsA /T-AsA 含量计算公式

a、AsA 含量计算

(1) 按样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{AsA}(\text{nmol/g 质量}) &= (\text{C 标准液} \times \Delta A_1 \text{ 测定管} \div \Delta A_1 \text{ 标准管} \times V \text{ 样}) \div (\text{W} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \\ &= 500 \times \Delta A_1 \text{ 测定管} \div \Delta A_1 \text{ 标准管} \div \text{W} \end{aligned}$$

(2) 按细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{AsA}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) &= (\text{C 标准液} \times \Delta A_1 \text{ 测定管} \div \Delta A_1 \text{ 标准管} \times V \text{ 样}) \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \\ &= 500 \times \Delta A_1 \text{ 测定管} \div \Delta A_1 \text{ 标准管} \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(3) 按液体体积计算

$$\text{AsA}(\text{nmol/mL}) = \text{C 标准液} \times \Delta A_1 \text{ 测定管} \div \Delta A_1 \text{ 标准管} \times 2 = 1000 \times \Delta A_1 \text{ 测定管} \div \Delta A_1 \text{ 标准管}$$

C 标准液：标准品的浓度，500 nmol/mL；V 样总：提取离心后上清液体积，1.0 mL；V 样：加入反应体系中上清液体积，0.05 mL；W：样本质量，g；2：稀释倍数，(500 μ L 液体+500 μ L 提取液) \div 500 μ L 液体=2。

b、T-AsA 含量计算

(1) 按样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{T-AsA}(\text{nmol/g 质量}) &= (\text{C 标准液} \times \Delta A_2 \text{ 测定管} \div \Delta A_2 \text{ 标准管} \times V \text{ 样}) \div (\text{W} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \\ &= 500 \times \Delta A_2 \text{ 测定管} \div \Delta A_2 \text{ 标准管} \div \text{W} \end{aligned}$$

(2) 按细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{T-AsA}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) &= (\text{C 标准液} \times \Delta A_2 \text{ 测定管} \div \Delta A_2 \text{ 标准管} \times V \text{ 样}) \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \\ &= 500 \times \Delta A_2 \text{ 测定管} \div \Delta A_2 \text{ 标准管} \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(3) 按液体体积计算

$$\text{T-AsA}(\text{nmol/mL}) = \text{C 标准液} \times \Delta A_2 \text{ 测定管} \div \Delta A_2 \text{ 标准管} \times 2 = 1000 \times \Delta A_2 \text{ 测定管} \div \Delta A_2 \text{ 标准管}$$

C 标准液：标准品的浓度，500 nmol/mL；V 样总：提取离心后上清液体积，1.0 mL；V 样：加入反应体系中上清液体积，0.05 mL；W：样本质量，g；2：稀释倍数，(500 μ L 液体+500 μ L 提取液) \div 500 μ L 液体=2。

c、DHA 含量计算

$$\text{DHA 含量} = \text{T-AsA 含量} - \text{AsA 含量}$$

(1) 按样本质量计算

$$\text{DHA}(\text{nmol/g 质量}) = 500 \times (\Delta A_2 \text{ 测定管} \div \Delta A_2 \text{ 标准管} - \Delta A_1 \text{ 测定管} \div \Delta A_1 \text{ 标准管}) \div \text{W}$$

(2) 按细胞数量计算

$$\text{DHA (nmol/10}^4 \text{ cell)} = 500 \times (\Delta A_2 \text{ 测定管} \div \Delta A_2 \text{ 标准管} - \Delta A_1 \text{ 测定管} \div \Delta A_1 \text{ 标准管}) \div \text{细胞数量}$$

(3) 按液体体积计算

$$\text{DHA (nmol/mL)} = 1000 \times (\Delta A_2 \text{ 测定管} \div \Delta A_2 \text{ 标准管} - \Delta A_1 \text{ 测定管} \div \Delta A_1 \text{ 标准管})$$

注意事项:

1. 加入试剂七时将枪头伸入液面以下加入，不可悬空滴加，否则会导致液体浑浊。
2. 空白管 1、空白管 2 及标准管只需测定 1-2 次。
3. A 大于 1 时，建议将样本用提取液稀释后再进行测定，并在计算时乘以相应的稀释倍数。
4. 本试剂盒可单独用于检测样本中 AsA 或 T-AsA 含量，也可在同时检测 AsA 与 T-AsA 含量后计算 DHA 含量。
5. 样本提取后当天检测。

实验实例:

- 1、取 0.1g 冬枣进行样本处理，按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A_1 \text{ 测定管} = (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) - (\text{A 空白管 1} - \text{A 空白管 2}) = (0.44 - 0.019) - (0.025 - 0.009) = 0.402$ 、 $\Delta A_1 \text{ 标准管} = \text{A 标准管} - \text{A 空白管 1} = 0.341 - 0.024 = 0.317$ ， $\Delta A_2 \text{ 测定管} = (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) - (\text{A 空白管 1} - \text{A 空白管 2}) = (0.591 - 0.020) - (0.024 - 0.008) = 0.555$ 、 $\Delta A_2 \text{ 标准管} = \text{A 标准管} - \text{A 空白管 1} = 0.375 - 0.024 = 0.351$ ，按照样本质量分别计算 AsA 含量及 T-AsA 含量得：

$$\text{AsA (nmol/g 质量)} = 500 \times \Delta A_1 \text{ 测定管} \div \Delta A_1 \text{ 标准管} \div W = 6340.7 \text{ nmol/g 质量}$$

$$\text{T-AsA (nmol/g 质量)} = 500 \times \Delta A_2 \text{ 测定管} \div \Delta A_2 \text{ 标准管} \div W = 7905.9 \text{ nmol/g 质量}$$