

抗坏血酸(AsA)含量检测试剂盒说明书

Ascorbic Acid Assay Kit

微量法

货号: AK120

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK120-A	100ml×1 瓶	4℃保存
AK120-B	20ml×1 瓶	4℃保存
AK120-C	液体×1 瓶	4℃保存
AK120-标准品	粉剂 x1 支	4℃保存

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 抗坏血酸 (Ascorbic Acid, AsA) 又称维生素 C, 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。

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。

试剂预配制:

AK120-C: 临用前加入 2.5mL AK120-B 混匀备用

AK120-标准品: 临用前配制, 加入 5.679 mL 蒸馏水充分溶解; 吸取 0.04 mL 上述溶液, 加入 0.96 mL 蒸馏水, 混匀, 即 400 μ mol/L AsA

AsA 提取:

1. 组织: 按照组织质量 (g) : AK120-A 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK120-A) 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) : AK120-A 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL AK120-A), 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。

检测步骤:

1. 紫外分光光度计/酶标仪预热 30min, 调节波长到 265 nm, 蒸馏水调零。
2. AK120-B 置于 25℃水浴中预热 30min。
3. 按顺序加入下列试剂:

试剂名称	标准管 (ul)	测定管 (ul)
标准液	20	
上清液		20
AK120-B	160	160

AK120-C	20	20
分别迅速混匀，在 265nm 测定，记录 30s 和 150s 的吸光值 A 标 1、A 标 2 和 A 标 3、A 标 4， ΔA 标准管=A 标 1-A 标 2， ΔA 测定管=A 标 3-A 标 4		

注意：标准管只需要测定 1-2 次。

计算公式：

1. 按蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{AsA (nmol/mg prot)} &= [\text{C 标准液} \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \times V \text{ 样}] \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \\ &= 400 \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

2. 按样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{AsA (nmol/g)} &= [\text{C 标准液} \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \times V \text{ 样}] \div (\text{W} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \\ &= 400 \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \div \text{W} \end{aligned}$$

3. 按细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{AsA (nmol/10}^4 \text{ cell)} &= [\text{C 标准液} \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \times V \text{ 样}] \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \\ &= 400 \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

4. 按液体体积计算

$$\begin{aligned} \text{AsA (nmol/mL)} &= [\text{C 标准液} \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \times V \text{ 样}] \div V \text{ 样} \\ &= 400 \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \end{aligned}$$

注：C 标准液：400 μ mol/L=400nmol/mL；V 样总：上清液总体积，1.0 mL；V 样：加入反应体系中上清液体积，0.02mL；Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL；W：样品质量 (g)；细胞数量：10⁴ 为单位计量，万。

注意事项：

1. AK120-C 和标准品现配现用，配制好的 4 $^{\circ}$ C 保存，3 天内使用完。
2. 如果样本初始吸光值大于 1.4，建议将样本用 AK120-A 稀释后进行测定。