

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0336

Size: 100T/96S

维生素 C/抗坏血酸 (AsA) 含量检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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。

二、测定原理:

在乙酸溶液中, 抗坏血酸与固蓝盐 B 反应生成黄色的草酰肼 - 2 - 羟基丁酰内酯衍生物, 在最大吸收波长 420nm 处测定吸光度。

三、需自备的仪器和用品:

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、可调式移液器和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 4mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 6mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉剂×2 瓶 (棕色)	4℃避光保存	临用前配制, 每瓶加入 7 mL 蒸馏水充分溶解, 用不完的试剂 4℃下可保存 3 天。

五、样品中 AsA 提取：

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 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液) 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): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL 提取液), 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。

六、AsA 测定操作：

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min, 调节波长到 420nm。
2. 在 EP 管中加入下列试剂

试剂名称 (μL)	测定管	空白管
样本	100	
提取液		100
试剂一	30	30
试剂二	50	50
试剂三	120	120
水	700	700

混匀, 25℃静置 20min, 吸取 200μL 加入微量石英比色皿/96 孔板中, 420nm 下测定各管吸光值。ΔA=A 测定-A 空白。

注意：空白管只需测定一次。

七、AsA 含量计算公式：

- 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线 $y = 0.0088x - 0.018$, $R^2 = 0.9978$

(1) 按蛋白浓度计算

$$\text{AsA } (\mu\text{g/mg prot}) = (\Delta A + 0.018) \div 0.0088 \times V_{\text{样}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}})$$

$$= 113.63 \times (\Delta A + 0.018) \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本质量计算

$$\text{AsA } (\mu\text{g/g 鲜重}) = (\Delta A + 0.018) \div 0.0088 \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}})$$

$$= 113.63 \times (\Delta A + 0.018) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

$$\text{AsA } (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = (\Delta A + 0.018) \div 0.0088 \times V_{\text{样}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}})$$

$$= 113.63 \times (\Delta A + 0.018) \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

$$\text{AsA } (\mu\text{g/mL}) = (\Delta A + 0.018) \div 0.0088 = 113.63 \times (\Delta A + 0.018)$$

$V_{\text{样}}$ ：加入样品体积，0.1mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1.0 mL； Cpr ：上清液蛋白质浓度，mg/mL； W ：样品质量(g)。

- 使用 96 孔板测定的计算公式如下

标准曲线 $y = 0.0044x - 0.018$, $R^2 = 0.9978$

(1) 按蛋白浓度计算

$$\text{AsA } (\mu\text{g/mg prot}) = (\Delta A + 0.018) \div 0.0044 \times V_{\text{样}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}})$$

$$= 227.27 \times (\Delta A + 0.018) \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本质量计算

$$\text{AsA}(\mu\text{g/g 鲜重}) = (\Delta A + 0.018) \div 0.0044 \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}})$$

$$= 227.27 \times (\Delta A + 0.018) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

$$\text{AsA}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = (\Delta A + 0.018) \div 0.0044 \times V_{\text{样}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}})$$

$$= 227.27 \times (\Delta A + 0.018) \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

$$\text{AsA}(\mu\text{g/mL}) = (\Delta A + 0.018) \div 0.0044 = 227.27 \times (\Delta A + 0.018)$$

V 样：加入样品体积，0.1 mL；V 样总：加入提取液体积，1.0 mL；Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL；W：样品质量（g）。

八、注意事项：

试剂三现配现用，配制好的 4℃ 保存，3 天内使用完。