

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-S0609

Size: 50T/48S

维生素 C/抗坏血酸 (AsA) 含量检测试剂盒说明书

分光光度法

*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脲 - 2 - 羟基丁酰内酯衍生物, 在最大吸收波长 420 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、1mL 玻璃比色皿、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 60mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 4mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	液体 6mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂三	粉剂×2 瓶(棕色)	4°C 避光保存	临用前配制, 每瓶加入 7mL 蒸馏水充分溶解, 用不完的试剂 4°C 下可保存 3 天

五、样品中 AsA 提取：

- 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。
- 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。
- 血清等液体：直接测定。

六、AsA 测定操作：

1. 分光光度计预热 30 min，调节波长到 420 nm，蒸馏水调零。
2. 在 EP 管中加入下列试剂

试剂名称 (μL)	测定管	空白管
样本	200	
提取液		200
试剂一	60	60
试剂二	100	100
试剂三	240	240
水	1400	1400

混匀，25℃静置 20min，吸取 1mL 加入 1mL 玻璃比色皿中，420nm 下测定各管吸光值。

$\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$

注意：空白管只需测定一次。

七、AsA 含量计算公式：

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

(1) 按蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{AsA } (\mu\text{g}/\text{mg prot}) &= (\Delta A + 0.018) \div 0.0088 \times V_{\text{样}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \\ &= 113.63 \times (\Delta A + 0.018) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{AsA } (\mu\text{g}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A + 0.018) \div 0.0088 \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \\ &= 113.63 \times (\Delta A + 0.018) \div W \end{aligned}$$

(3) 按细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{AsA } (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta A + 0.018) \div 0.0088 \times V_{\text{样}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \\ &= 113.63 \times (\Delta A + 0.018) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(4) 按液体体积计算

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

V 样：加入样品体积，0.2mL；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）。

七、注意事项：

试剂三现配现用，配制好的 4°C 保存，3 天内使用完。