

还原型抗坏血酸 (ascorbic acid, AsA) 含量测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

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 420 处测定吸光度。

自备仪器和用品：

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。

试剂组成和配制：

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。（注意：微量粉剂可能肉眼看不见，正常溶解即可）

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（10⁴ 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。

AsA 测定操作：

1. 分光光度计/酶标仪预热 30 min，调节波长到 420 nm。
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。

AsA 含量计算公式：

a. 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

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

(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

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

V 样: 加入样品体积, 0.1mL; 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)。

b.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

$$\begin{aligned} \text{AsA } (\mu\text{g}/\text{mg prot}) &= (\Delta A + 0.018) \div 0.0044 \times V_{\text{样}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \\ &= 227.27 \times (\Delta A + 0.018) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2). 按样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{AsA } (\mu\text{g}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A + 0.018) \div 0.0044 \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \\ &= 227.27 \times (\Delta A + 0.018) \div W \end{aligned}$$

(3). 按细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{AsA } (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta A + 0.018) \div 0.0044 \times V_{\text{样}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \\ &= 227.27 \times (\Delta A + 0.018) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(4) 按液体体积计算

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

V 样: 加入样品体积, 0.1mL; 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)。

注意事项:

1. 试剂三现配现用, 配制好的 4°C 保存, 3 天内使用完。