还原型抗坏血酸（ascorbic acid，AsA）含量测定试剂盒说明书

分光光度法　50 管/48 样

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、1mL 玻璃比色皿、可调式移液器和蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体 60mL×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（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。

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。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:

标准曲线 y = 0.0088x - 0.018 ，R2 = 0.9978

(1). 按蛋白浓度计算

AsA (μg/mg prot) =(ΔA+0.018)÷0.0088×V 样÷（Cpr×V 样）

=113.63×(ΔA+0.018)÷Cpr

(2). 按样本质量计算

AsA(μg/g 鲜重) =(ΔA+0.018)÷0.0088×V 样÷(W×V 样÷V 样总)

=113.63×(ΔA+0.018)÷W

(3). 按细胞数量计算

AsA(μg/104 cell) =(ΔA+0.018)÷0.0088×V 样÷(细胞数量×V 样÷V 样总)

=113.63×(ΔA+0.018)÷细胞数量

（4）按液体体积计算

AsA (μg/mL) =(ΔA+0.018)÷0.0088

=113.63×(ΔA+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）。

注意事项：

1. 试剂三现配现用，配制好的 4℃保存，3 天内使用完。