

## 还原型抗坏血酸 (AsA) 含量测定试剂盒说明书

(货号: G0201F 分光法 48 样)

### 一、产品简介:

抗坏血酸 AsA 又称维生素 C。是一种重要的抗氧化剂,在氧化还原代谢反应中起调节作用,抗坏血酸 (AsA) 与脱氢抗坏血酸 (DHA) 的比值 (AsA/ DHA) 是反映细胞氧化状态的另一个重要指标。

还原型抗坏血酸 (AsA) 把三价铁离子还原成二价铁离子,二价铁离子与红菲咯啉反应生成红色络合物,在 534nm 处有特征吸收峰,颜色深浅与还原型抗坏血酸含量成正比。

### 二、试剂盒的组成和配制:

| 试剂名称 | 规格                           | 保存要求 | 备注                                                                                                   |
|------|------------------------------|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 提取液  | 液体 60mL×1 瓶                  | 4℃保存 |                                                                                                      |
| 试剂一  | 液体 15mL×1 瓶                  | 4℃保存 |                                                                                                      |
| 试剂二  | A: 液体 0.2mL×1 支<br>试剂瓶 B(空瓶) | 4℃保存 | 试剂二 B 液配制: 临用前取 0.024mLA 液至试剂瓶 B 中,再加 4.976mL 无水乙醇,混匀备用。                                             |
| 试剂三  | 粉体 mg×1 瓶                    | 4℃保存 | 用前甩几下使粉体落入底部,再加 10mL 无水乙醇混匀溶解 (该试剂难溶,可超声溶解)。                                                         |
| 试剂四  | 液体 5mL×1 瓶                   | 4℃保存 | 溶液为淡黄色。                                                                                              |
| 标准品  | 粉剂×2 支                       | 4℃保存 | 临用前: 每支用前甩几下标准品管,使粉剂落入底部,再加入 1mL 试剂一混匀溶解,即得 5mg/mL,再用试剂一稀释 500 倍 (1:499) 为 0.01mg/mL 溶液即为标准液 (现配现用)。 |

### 三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、研钵、冰、低温离心机、无水乙醇、可调式移液器和蒸馏水。

### 四、还原型抗坏血酸 (AsA) 含量测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

#### 1、样本制备:

##### ① 组织样本:

称取约 0.1g 组织(水分充足的果实样本取约 0.5g 组织或更多),加入 1mL 预先预冷的提取液,进行冰浴匀浆,室温静提 10min 后,12000rpm,4℃离心 10min,取上清,置冰上待测。

【注】:若增加样本,可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取

##### ② 液体样本: 直接检测。若浑浊,离心后取上清检测。

##### ③ 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内,离心后弃上清;取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液,在 4℃ 或冰浴进行匀浆(使用各类常见电动匀浆器或超声破碎)。4℃ 约 12,000rpm

离心 10min，取上清作为待测样品。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量( $10^4$ ):提取液(mL)为 500~1000:1 的比例进行提取。

## 2、上机检测：

- ① 可见分光光度计预热 30 min，调节波长到 534nm，蒸馏水调零。
- ② 叶片类样本直接检测即可，果肉类样本一般需先稀释 10 倍再检测（可按照加样表操作时加入 30 $\mu$ L 样本，试剂一增加为 420 $\mu$ L）。
- ③ 依次在 EP 管中依次加入：

| 试剂名称 ( $\mu$ L)                                                                              | 测定管 | 标准管<br>(仅做一次) | 空白管<br>(仅做一次) |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---------------|---------------|
| 样本                                                                                           | 300 |               |               |
| 标准液                                                                                          |     | 300           |               |
| 提取液                                                                                          |     |               | 300           |
| 试剂一                                                                                          | 150 | 150           | 150           |
| 无水乙醇                                                                                         | 150 | 150           | 150           |
| 试剂二 B 液                                                                                      | 75  | 75            | 75            |
| 试剂三                                                                                          | 150 | 150           | 150           |
| 试剂四                                                                                          | 75  | 75            | 75            |
| 混匀，于 30℃反应 60min 后，立即取全部澄清液体（若有沉淀需 8000rpm，室温离心 5min，取上清液）至 1mL 玻璃比色皿中，立即于 534nm 处读取各管吸光值 A。 |     |               |               |

- 【注】 1.若提取完的样本上清液有较强的背景色（如粉色，红色等），需增设一个样本自身对照：即对照管为 300 $\mu$ L 样本+150 $\mu$ L 试剂一+75 $\mu$ L 试剂二 B 液+375 $\mu$ L 无水乙醇，30℃反应 60min 后，剩余步骤同测定管， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}$ 。
- 2.若测定管大于 0.5，可对样本进行稀释 D，或降低样本量 V1 则试剂一相应增加。则稀释倍数 D 或改变后的样本体积 V1 需代入公式重新计算。
- 3.若 A 测定-A 空白的差值小于 0.01，可增加样本加样量 V1（如增至 0.45mL，则试剂一减至 0mL；或增至 0.6mL，则试剂一和无水乙醇均减至 0mL），或增加样本取样质量 W（如由 0.1g 增至 0.2g 或更多）。则改变后的 V1 和 W 需代入公式重新计算。

## 五、结果计算：

### 1、按样本质量计算：

$$\text{AsA}(\text{mg/g 鲜重}) = [(A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})] \times (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \div (W \times V1 \div V) \times D \\ = 0.01 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D$$

### 2、按液体体积计算：

$$\text{AsA}(\text{mg/mL}) = [(A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})] \times (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \div V1 \times D \\ = 0.01 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

### 3、按细菌/细胞数量计算：

$$\text{AsA}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [(A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})] \times (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \times 10^3 \div (500 \times V1 \div V) \times D \\ = 10 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div 500 \times D$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入反应体系中上清液体积，0.3mL；

V 标准---加入标准液体积，0.3mL；

C 标准---标准液浓度，0.01mg/mL；

W---样品质量（g）；

D---稀释倍数，若没有稀释即为 1；

500---细胞数量，万。