

还原型抗坏血酸 (AsA) 含量检测试剂盒

(货号: SH3011 酶标法 96T)

一、产品简介

还原型抗坏血酸 (Ascorbic Acid, AsA), 又称维生素 C, 是生物体内重要的抗氧化剂和辅因子, 在氧化还原反应代谢中起调节作用。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一个重要指标。

二、检测原理

本试剂盒采用红菲咯啉比色法: 还原型抗坏血酸 (AsA) 在酸性条件下将三价铁离子 (Fe^{3+}) 还原为二价铁离子 (Fe^{2+}), Fe^{2+} 与红菲咯啉 (4, 7-二苯基-1, 10-菲咯啉, BP) 反应生成红色络合物。该产物在 534 nm 波长处有特征吸收峰, 在特定浓度范围内, 吸光度值与抗坏血酸含量呈正比。

三、试剂盒组分与规格

试剂名称	规格	保存条件	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	液体 0.2mL×1 支	4℃ 保存	临用前取出 0.024mL, 再加 4.976mL 无水乙醇, 混匀备用。
试剂三	粉体×1 瓶	4℃ 保存	临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 6mL×1 瓶	4℃ 避光保存	溶液为淡黄色。
标准品	粉体×2 支	4℃ 保存	临用前甩几下标准品管, 使粉末落入底部, 再加入 1 mL 试剂一混匀溶解, 即得 1mg/mL, 再用试剂一稀释 100 倍 (1: 99) 为 0.01mg/mL 溶液即为标准液 (现配现用)。

四、保存条件: 4℃ 保存, 6 个月有效。

五、所用到的仪器和用品

酶标仪、台式低温离心机、可调式移液器、96 孔板、匀浆器、无水乙醇和蒸馏水。

六、还原型抗坏血酸 (AsA) 含量测定

正式实验前务必选取 2-3 个预期差异较大的样本做测定, 了解本批样本情况, 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 (水分充足的样本取 0.5g 或更多), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 在 4℃ 12000g 离心 10min, 取上清待测。

【注】若增加样本量, 可以按照组织质量 (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；按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000g 4℃ 离心 10min，取上清待测。

③液体样本：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测

①酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 534nm。

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（可按照加样表加入 20 μ L 样本，试剂一增加为 280 μ L）。

③在 EP 管中依次加入：

试剂名称（ μ L）	测定管	标准管 （仅做一次）	空白管 （仅做一次）
样本	200		
标准液		200	
提取液			200
试剂一	100	100	100
无水乙醇	100	100	100
试剂二（稀释后）	50	50	50
试剂三	100	100	100
试剂四	50	50	50
混匀，于 30℃ 反应 60min 后，于 8000g 室温离心 5min 后，立即取出 200 μ L 澄清液体至 96 孔板中，立即于 534nm 处读取各管吸光值 A。			

七、结果计算

1、按样本鲜重计算：

$$\text{AsA}(\text{mg/g 鲜重}) = \frac{(\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times (\text{C 标准} \times \text{V 标准})}{\text{W} \times \text{V1} \div \text{V}} \times \text{D}$$

2、按照细菌或细胞数量计算：

$$\text{AsA}(\mu\text{g}/10^4\text{cell}) = \frac{(\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times (\text{C 标准} \times \text{V 标准}) \times 10^3}{(500 \times \text{V1} \div \text{V}) \times \text{D}}$$

3、按照液体体积计算：

$$\text{AsA}(\text{mg/mL}) = \frac{(\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times (\text{C 标准} \times \text{V 标准})}{\text{V1} \times \text{D}}$$

V---加入提取液体积，1mL；

V1---加入样本体积，0.2mL；

V 标准---加入标准液体积，0.2mL；

C 标准---标准液浓度，0.01mg/mL；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

W---样本质量，g；

500---细胞数量，万；