

## 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°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7 mL蒸馏水充分溶解，用不完的试剂4°C下可保存3天。

#### 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°C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°C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，蒸馏水调零。

2. 在EP管中加入下列试剂

试剂名称（ $\mu$ L）	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°C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。

### 还原型抗坏血酸（ascorbic acid, AsA）含量测定试剂盒说明书注意：标准管只需测定一次。

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

$$\text{AsA } (\mu\text{g/mL}) = (\Delta A + 0.018) \div 0.0044$$

$$= 227.27 \times (\Delta A + 0.018)$$

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。