

抗坏血酸（AsA）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AYFA8-C24	抗坏血酸(AsA)试剂盒	24T	常量法
AYFA8-C48		48T	

一、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。

二、测定原理：

本法用 Fe^{3+} 与抗坏血酸迅速作用生成 Fe^{2+} ，后者再与啡罗啉显色反应，可以测定样本中维生素 C 的含量。

三、试剂组成：

试剂名称	试剂装量(24T)	试剂装量(48T)	保存条件
提取液	液体 30 mL×1 瓶	液体 60 mL×1 瓶	2~8℃保存
试剂一	液体 18 mL×1 瓶	液体 22 mL×1 瓶	2~8℃保存
试剂二	液体 10 mL×1 瓶	液体 18 mL×1 瓶	2~8℃保存
试剂三	液体 18 mL×1 瓶	液体 32mL×1 瓶	2~8℃保存
试剂四	液体 10 mL×1 瓶	液体 18 mL×1 瓶	2~8℃保存
标准品	粉剂×1 支	粉剂×1 支	2~8℃保存
	临用前在每支粉剂中加入 10mL 试剂一配制成 1mg/mL 的标准液备用。		

四、操作步骤：

样本前处理

1、组织：取一定量植物组织擦净水分及杂质，剪碎后放入研钵，加入液氮，研磨成粉状后转移出来，然后准确称重，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），旋涡混匀抽提 3-5 分钟或者使用组织破碎仪冰浴提取，8000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、细菌/细胞：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 200W，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 5min）；然后 10000g，4℃离心 10min，取上清置于冰上待测。

3、血清（浆）等液体样本：直接测定。若有浑浊请离心后取上清待测。

测定步骤

- 1、分光光度计预热30min 以上，调节波长至500nm，蒸馏水调零。
- 2、测定前将配制好的1mg/mL标准液用试剂一稀释成50、25、12.5、6.25、3.125、1.5625μg/mL的标准液待用。
- 3、取100μL样本于离心管中，加入100μL试剂一，重复混匀，10000g，4℃离心10min，取上清液待测。
- 4、操作表(1.5mL离心管):

试剂名称	测定管	标准管	空白管
试剂一 (μL)	-	-	100
不同浓度标准液 (μL)	-	100	-
上清液 (μL)	100	-	-
试剂二 (μL)	250	250	250
试剂三 (μL)	500	500	500
试剂四 (μL)	250	250	250
充分混匀，37℃水浴 20min，后在波长 500nm 处读取吸光度值，分别记为 A 测定、A 标准、A 空白，计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。			

五、AsA 含量的计算:

以吸光度值 ΔA 标准为横坐标，抗坏血酸浓度为纵坐标，绘制标准曲线。将 ΔA 测定代入标准曲线得到样本中抗坏血酸浓度为 y(μg/mL)。

- 1、按样本蛋白浓度计算:

$$\text{AsA}(\mu\text{g/mL}) = y \div \text{Cpr}$$

- 2、按样本质量计算:

$$\text{AsA}(\mu\text{g/mL}) = y \div (V_{\text{样总}} \div W)$$

V_{样总}: 加入提取液体积，1 mL;

Cpr: 样本蛋白质浓度，mg/mL;

W: 样本质量，g;

六、注意事项:

不同样本抗坏血酸含量相差较大，若 ΔA 大于0.6时，建议将样本稀释后测定；如果 ΔA 过小时，可以适当加大样本量后重新测定，注意同步修改公式。