

## 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 |
|-----------|--------------|------|------|
| PMHF8-M48 | 抗坏血酸(AsA)试剂盒 | 48T  | 微量法  |
| PMHF8-M96 |              | 96T  |      |

### 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(48T)                              | 试剂装量(96T)     | 保存条件    |
|------|--|---------------|---------|
| 提取液  | 液体 60 mL×1 瓶                           | 液体 110 mL×1 瓶 | 2~8℃ 保存 |
| 试剂一  | 液体 16 mL×1 瓶                           | 液体 20 mL×1 瓶  | 2~8℃ 保存 |
| 试剂二  | 液体 3 mL×1 瓶                            | 液体 6 mL×1 瓶   | 2~8℃ 保存 |
| 试剂三  | 液体 6 mL×1 瓶                            | 液体 12 mL×1 瓶  | 2~8℃ 保存 |
| 试剂四  | 液体 3 mL×1 瓶                            | 液体 6 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（ $10^4$  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 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。

#### 测定步骤

- 1、酶标仪预热30min 以上，调节波长至500nm。
- 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、1.5625 $\mu$ g/mL的标准液待用。
- 3、取50 $\mu$ L样本于离心管中，加入50 $\mu$ L试剂一，重复混匀，10000g，4 $^{\circ}$ C离心10min，取上清液待测。
- 4、操作表（96孔板）：

| 试剂名称  | 测定管 | 标准管 | 空白管 |
|---|-----|-----|-----|
| 试剂一（ $\mu$ L）   | -   | -   | 20  |
| 不同浓度标准液（ $\mu$ L）   | -   | 20  | -   |
| 上清液（ $\mu$ L）   | 20  | -   | -   |
| 试剂二（ $\mu$ L）   | 50  | 50  | 50  |
| 试剂三（ $\mu$ L）   | 100 | 100 | 100 |
| 试剂四（ $\mu$ L）   | 50  | 50  | 50  |
| 充分混匀，37 $^{\circ}$ C温浴 20min，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 $\Delta A$ 测定=A 测定-A 空白， $\Delta A$ 标准=A 标准-A 空白。 |     |     |     |

#### 五、AsA 含量的计算：

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

- 1、按血清（浆）等液体体积计算：

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

- 2、按样本蛋白浓度计算：

$$AsA(\mu\text{g/mL}) = y \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) = y \div C_{\text{pr}}$$

- 3、按样本质量计算：

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

- 4、按细胞/细菌数量计算：

$$AsA(\mu\text{g/mL}) = y \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量})$$

**V 样：**加入样本体积 0.02mL；

**V 样总：**提取液体积，1mL；

**Cpr：**样本蛋白浓度，mg/mL；

**W：**样本质量，g；

#### 六、注意事项：

- 1、不同样本抗化血酸含量相差较大，若 $\Delta A$ 大于0.6时，建议将样本稀释后测定；如果

$\Delta A$ 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。

2、