

总抗坏血酸（TAA）含量测定试剂盒说明书

(货号: BP10452F-48 分光法 48 样)

一、指标介绍:

总抗坏血酸（TAA）包括还原型和脱氢型抗坏血酸,其中还原型抗坏血酸易被氧化为脱氢型抗坏血酸,后者与 2, 4-二硝基苯肼作用生成可溶于硫酸的红色脎, 该红色物质在 520nm 下有最大吸收峰, 进而计算得到总总抗坏血酸（TAA）含量。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉剂 1 瓶	4℃ 避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 25ml 的 25%硫酸，混匀，4℃保存。
标准品	粉剂 1 支	4℃ 保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、**浓硫酸**、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取:

① 组织样本:

称取约 0.3g 组织(水分充足的样本取约 0.5g 组织)，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。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。

2、检测步骤:

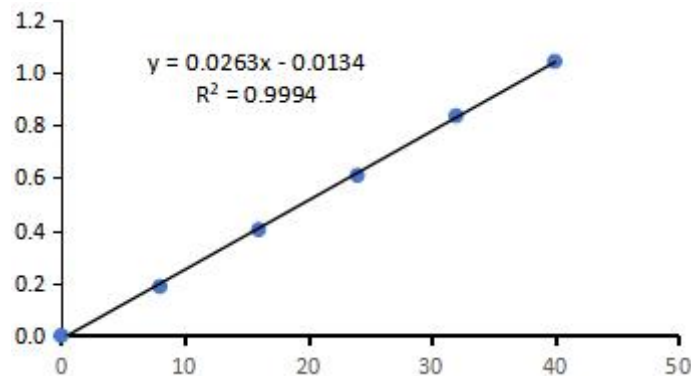
① 分光光度计预热 30 min，调节波长到 520 nm，蒸馏水调零。

② 依次在 EP 管中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	80	80
试剂一	240	
38℃（恒温培养箱或水浴锅），孵育 3 小时		
试剂一		240
85%硫酸 (务必在冰上缓慢加入)	560	560
混匀，室温 25℃静置 20min（准确时间）。液体全部转移至 1mL 玻璃比色皿中，于 520nm 处分别读取 A 值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个测定管需要一个对照管）		

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y=0.0263x-0.0134$ ， x 是标准品 VC 质量 (μg)， y 是 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算

$$\text{TAA } (\mu\text{g}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0134) \div 0.0263] \div (\text{Cpr} \times V1) \times D = 475.3 \times (\Delta A + 0.0134) \div \text{Cpr} \times D$$

3、按样本质量计算

$$\text{TAA } (\mu\text{g}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0134) \div 0.0263] \div (W \times V1 \div V) \times D = 475.3 \times (\Delta A + 0.0134) \div W \times D$$

4、按液体体积计算

$$\text{TAA } (\mu\text{g}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0134) \div 0.0263] \div V1 \times D = 475.3 \times (\Delta A + 0.0134) \times D$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入反应体系中上清液体积，0.08mL；

W---样品质量 (g)；

D---稀释倍数，若没有稀释即为 1；

Cpr---上清液蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

1 向标准品中加入 2mL 蒸馏水，充分溶解，（母液需在两天内用且-20℃保存），标准品母液浓度为 0.5mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5. mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

标品浓度 mg/mL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0

各标准管混匀待用。

3 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	80	
蒸馏水		80
试剂一	240	240

38℃（恒温培养箱或水浴锅）， 孵育 3 小时		
85%硫酸 （务必在冰上缓慢 加入）	560	560
混匀，室温 25℃静置 20min（准确时间）。液体全部转移至 1mL 玻璃比色皿中，于 520nm 处分别读取 A 值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{测定}-0}$ 浓度管。		