

## 总抗坏血酸（TAA）含量测定试剂盒说明书

(货号：BP10452W-96 微板法 96 样 有效期：6 个月)

### 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 110mL×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）；<br>2. 加入 15ml 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；<br>2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制；<br>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）、96 孔板、离心管、酶标仪、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：

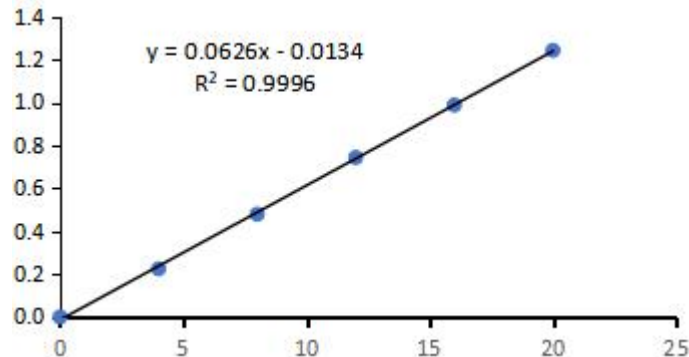
##### ① 酶标仪预热 30 min，调节波长到 520 nm。

##### ② 依次在 96 孔板中或 EP 管中依次加入：

| 试剂组分 (μL)                                                                                                              | 测定管 | 对照管 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 样本                                                                                                                     | 20  | 20  |
| 试剂一                                                                                                                    | 60  |     |
| 38℃（恒温培养箱，若用 96 孔板，则需用板子或保鲜膜遮盖，防止水分蒸发），孵育 3 小时                                                                         |     |     |
| 试剂一                                                                                                                    |     | 60  |
| 85%硫酸<br>(务必在冰上缓慢加入)                                                                                                   | 140 | 140 |
| 混匀，室温 25℃静置 20min（准确时间）。液体全部转移至 96 孔板中，于 520nm 处分别读取 A 值，<br>$\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个测定管需要一个对照管） |     |     |

## 五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.0626x - 0.0134$ ， $x$  是标准品 VC 质量 ( $\mu\text{g}$ )， $y$  是  $\Delta A$ 。



2、按蛋白浓度计算

$$\text{TAA}(\mu\text{g}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0134) \div 0.0626] \div (\text{Cpr} \times V1) \times D = 798.7 \times (\Delta A + 0.0134) \div \text{Cpr} \times D$$

3、按样本质量计算

$$\text{TAA}(\mu\text{g}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0134) \div 0.0626] \div (W \times V1 \div V) \times D = 798.7 \times (\Delta A + 0.0134) \div W \times D$$

4、按液体体积计算

$$\text{TAA}(\mu\text{g}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0134) \div 0.0626] \div V1 \times D = 798.7 \times (\Delta A + 0.0134) \times D$$

V----加入提取液体积，1 mL；

V1----加入反应体系中上清液体积，0.02mL；

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。

W----样品质量 (g)；

D----稀释倍数，若没有稀释即为 1。

附：标准曲线制作过程：

1 向标准品中加入 1mL 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 1mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. 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<br>mg/mL | 0   | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1   |
|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 标品稀释液<br>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 ( $\mu\text{L}$ )           | 标准管 | 0 浓度管 (仅做一次) |
|----------------------------------|-----|--------------|
| 标品                               | 20  |              |
| 蒸馏水                              |     | 20           |
| 试剂一                              | 60  | 60           |
| 38℃ (恒温培养箱，若用 96 孔板，则需用板子或保鲜膜遮盖， |     |              |

|                                                                                   |     |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 防止水分蒸发)， 孵育 3 小时。                                                                 |     |     |
| 85%硫酸<br>(务必在冰上缓慢<br>加入)                                                          | 140 | 140 |
| 混匀，室温 25℃静置 20min（准确时间）。液体全部转移至 96<br>孔板中，于 520nm 处读取 A 值， $\Delta A=A$ 测定-0 浓度管。 |     |     |