

还原型抗坏血酸（AsA）含量测定试剂盒说明书

（货号：BP10454W 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

抗坏血酸 AsA 又称维生素 C。是一种重要的抗氧化剂，在氧化还原代谢反应中起调节作用，抗坏血酸（AsA）与脱氢抗坏血酸（DHA）的比值（AsA/ DHA）是反映细胞氧化状态的另一个重要指标。

还原型抗坏血酸（AsA）把三价铁离子还原成二价铁离子，二价铁离子与红菲咯啉反应生成红色络合物，在 534nm 处有特征吸收峰，颜色深浅与还原型抗坏血酸含量成正比。

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 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	A: 液体 0.2mL×1 支 试剂瓶 B(空瓶)	4℃保存	试剂二 B 液配制： 1. 临用前取出 0.047mLA 液至试剂瓶 B 中，再加 9.953mL 无水乙醇，混匀备用； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	粉体 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 13mL 无水乙醇混匀溶解（该试剂难溶，可超声溶解）； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	液体 5mL×1 瓶	4℃避光保存	1. 溶液为淡黄色； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	粉剂 2 支	4℃保存	每支： 1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 1mL 试剂一混匀溶解，即得 1mg/mL 标准液（现配现用）。

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、无水乙醇、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 0.1g 组织(水分充足的果实样本取约 0.5g 组织或更多)，加入 1mL 预先预冷的提取液，进行冰浴匀浆，室温静提 10min 后，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。

③ 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，在 4℃ 或冰浴进行匀浆（使用各类常见电动匀浆器或超声破碎）。4℃ 约 12,000rpm 离心 10min，取上清作为待测样品。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量(10^4):提取液(mL)为 500~1000:1 的比例进行提取。

2、检测步骤：

① 酶标仪预热 30 min，调节波长到 534nm。

② 叶片类样本直接检测即可，果肉类样本一般需先稀释 10 倍再检测（可按照加样表操作时加入 20μL 样本，试剂一增加为 280μL）

③ 依次在 EP 管中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管	标准管 (仅做一次)	空白管 (仅做一次)
样本	200		
标准液		200	
提取液			200
试剂一	100	100	100
无水乙醇	100	100	100
试剂二 B 液	50	50	50
试剂三	100	100	100
试剂四	50	50	50
混匀，于 30℃ 反应 60min 后，立即取出 200μL 澄清液体（若有沉淀需 8000rpm，室温离心 5min，取上清液）至 96 孔板中，立即于 534nm 处读取各管吸光值 A。			

【注】1.若提取完的样本上清液有较强的背景色（如粉色，红色等），需增设一个样本自身对照：即对照管为 200μL 样本+100μL 试剂一+50μL 试剂二 B 液+250μL 无水乙醇，30℃ 反应 60min 后，剩余步骤同测定管， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}$ 。

2.若测定管大于 0.8，可对样本进行稀释 D，或降低样本量则试剂一相应增加。则稀释倍数 D 或改变后的样本体积 V1 需代入公式重新计算。

3.若 A 测定-A 空白的差值小于 0.01，可增加样本加样量 V1（如增至 0.3mL，则试剂一减至 0mL；或增至 0.4mL，则试剂一和无水乙醇均减至 0mL），或增加样本取样质量 W（如由 0.1g 增至 0.2g 或更多）。则改变后的 V1 和 W 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本质量计算：

$$AsA(\text{mg/g 鲜重}) = [(A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})] \times (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \div (W \times V1 \div V) \times D \\ = 1 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D$$

2、按液体体积计算：

$$AsA(\text{mg/mL}) = [(A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})] \times (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \div V1 \times D \\ = 1 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

3、按细菌/细胞数量计算：

$$AsA(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [(A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})] \times (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \times 10^3 \div (500 \times V1 \div V) \times D \\ = 1000 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div 500 \times D$$

4、按蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{AsA}(\text{mg/mg prot}) &= [(A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白})] \times (C \text{ 标准} \times V \text{ 标准}) \div (C_{\text{pr}} \times V_1 \div V) \times D \\ &= 1 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div C_{\text{pr}} \times D \end{aligned}$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入反应体系中上清液体积，0.2mL；

V 标准---加入标准液体积，0.2mL；

C 标准---标准液浓度，1mg/mL；

W---样品质量（g）；

D---稀释倍数，若没有稀释即为 1；

500---细胞数量，万。

Cpr---蛋白浓度（mg/mL）； 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。