



货号: MS1300

规格: 100 管/96 样

抗坏血酸 (ascorbic acid, AsA) 含量测定试剂盒说明书

微量法

注意: 正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

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。

测定原理:

抗坏血酸氧化酶(AAO)催化AsA氧化生成DHA, 通过测定AsA的氧化速率, 即可计算出AsA含量。

自备实验用品及仪器:

研钵、冰、低温离心机、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板、可调式移液器和蒸馏水。

试剂组成和配置:

试剂一: 液体×1瓶, 4℃保存。

试剂二: 液体×1瓶, 4℃保存。

试剂三: 液体×1瓶, 4℃保存。临用前加入2.5 mL试剂二, 混匀。

标准品: 粉剂×1瓶(棕色), 4℃保存。临用前配制, 加入5.679 mL蒸馏水充分溶解; 吸取0.1 mL上述溶液, 加入0.9 mL蒸馏水, 混匀, 即100 μmol/L AsA。

操作步骤:

一、样品中AsA提取:

按照组织质量(g): 试剂一体积(mL)为1: 5~10的比例(建议称取约0.1g组织, 加入1mL试剂一)进行冰浴匀浆, 10000rpm 4℃离心20min, 取上清液待测。

二、AsA测定操作:

1. 分光光度计预热30 min, 调节波长到265 nm, 蒸馏水调零。
2. 试剂二在25℃水浴锅中预热30 min以上。
3. 标准管: 依次在微量石英比色皿/96孔板中加入20μL标准液、160μL试剂二和20μL试剂三, 迅速混匀, 在265nm测定, 记录30s和150s的吸光值A1和A2, $\Delta A_{\text{标准管}} = A1 - A2$ 。只需做1~2个。
4. 测定管: 依次在微量石英比色皿/96孔板中加入20μL上清液、160μL试剂二和20μL试剂三, 迅速混匀, 在265nm测定, 记录30s和150s的吸光值A3和A4, $\Delta A_{\text{测定管}} = A3 - A4$ 。

三、AsA含量计算:

- a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下



(1) 按蛋白浓度计算

$$\begin{aligned}\text{AsA } (\mu\text{mol/mg prot}) &= [\text{C标准液} \times (\Delta\text{A测定管} \div \Delta\text{A标准管}) \times \text{V样总}] \div \text{Cpr} \\ &= 0.1 \times \Delta\text{A测定管} \div \Delta\text{A标准管} \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算

$$\begin{aligned}\text{AsA } (\mu\text{mol/g}) &= [\text{C标准液} \times (\Delta\text{A测定管} \div \Delta\text{A标准管}) \times \text{V样总}] \div \text{W} \\ &= 0.1 \times \Delta\text{A测定管} \div \Delta\text{A标准管} \div \text{W}\end{aligned}$$

C标准液: 100 $\mu\text{mol/L}$; V样总: 上清液总体积, 1.0 mL=1 $\times 10^{-3}$ L; Cpr: 上清液蛋白质浓度, mg/mL; W: 样品质量 (g)。

b. 使用96孔板测定的计算公式如下

(1) 按蛋白浓度计算

$$\begin{aligned}\text{AsA } (\mu\text{mol/g prot}) &= [\text{C标准液} \times (\Delta\text{A测定管} \div \Delta\text{A标准管}) \times \text{V样总}] \div \text{Cpr} \\ &= 0.1 \times \Delta\text{A测定管} \div \Delta\text{A标准管} \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算

$$\begin{aligned}\text{AsA } (\mu\text{mol/g}) &= [\text{C标准液} \times (\Delta\text{A测定管} \div \Delta\text{A标准管}) \times \text{V样总}] \div \text{W} \\ &= 0.1 \times \Delta\text{A测定管} \div \Delta\text{A标准管} \div \text{W}\end{aligned}$$

C标准液: 100 $\mu\text{mol/L}$; V样总: 上清液总体积, 1.0 mL=1 $\times 10^{-3}$ L; Cpr: 上清液蛋白质浓度, mg/mL; W: 样品质量 (g)。