抗坏血酸（AsA）含量检测试剂盒说明书

微量法

货号：BC1235

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 100 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 20 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 10μL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 瓶	2-8℃保存

溶液的配制：

1. 试剂三：液体置于试剂瓶内 EP 管中。临用前根据用量按照试剂三:试剂二为 1:250 的体积比例充分混匀，现用现配；
2. 标准品：临用前配制，加入 5.679 mL 蒸馏水充分溶解，即 10 mmol/L AsA；吸取 0.04mL 上述溶液，加入 0.96mL 蒸馏水，混匀，即 400 μmol/L AsA。

产品说明：

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。

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。

Ascorbic Acid (265nm) $\xrightarrow{\text{Ascorbic Acid Oxidase}}$ Dehydroascorbic Acid

技术指标：

最低检出限：0.7539 μmol/L

线性范围：6.25-1400 μmol/L

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰、低温离心机、微量石英比色皿/96孔UV板、可调式移液器、蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1、组织：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。8000g，4℃离心 20min，取上清置冰上待测。

2、细菌/细胞：按照细菌/细胞数量（10^4 个）：试剂一体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌/细胞加入 1mL 试剂一），冰浴超声波破碎细胞/细菌（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；8000g，4℃离

心 20min，取上清液置冰上混匀待测。

3、血清等液体：直接测定。

二、测定步骤

1、紫外分光光度计/酶标仪预热30min，调节波长到265nm，分光光度计蒸馏水调零。

2、试剂二在25℃水浴锅中预热30min以上。

3、标准管：依次在微量石英比色皿/96孔UV板中加入20μL标准液、160μL试剂二和20μL试剂三，迅速混匀后于265nm测定，记录10s和130s的吸光值A1和A2。ΔA标准管=A1-A2。

4、测定管：依次在微量石英比色皿/96孔UV板中加入20μL上清液、160μL试剂二和20μL试剂三，迅速混匀后于265nm测定，记录10s和130s的吸光值A3和A4。ΔA测定管=A3-A4。

注意：如果样本数量较大。可将试剂二与试剂三按照8:1的体积比混匀配成工作液使用，根据样本所需现配现用，禁止一次性配完。加样顺序为180 μL工作液、20 μL上清液（或标准液），加入上清液（或标准液）即开始计时。（标准管只需测定1-2次）

三、AsA 含量计算公式

1、按蛋白浓度计算：

AsA含量 (nmol/mg prot) =(C标准液×ΔA测定管÷ΔA标准管×V样)÷(Cpr×V样)=400×ΔA测定管÷ΔA标准管÷Cpr

2、按样本质量计算：

AsA含量(nmol/g 质量) =(C标准液×ΔA测定管÷ΔA标准管×V样)÷(W×V样÷V样总)

=400×ΔA测定管÷ΔA标准管÷W

3、按细胞/细菌数量计算：

AsA含量(nmol/10^4 cell) =(C标准液×ΔA测定管÷ΔA标准管×V样)÷(细胞数量×V样÷V样总)

=400×ΔA测定管÷ΔA标准管÷细胞数量

4、按液体体积计算：

AsA含量(nmol/mL) =(C标准液×ΔA测定管÷ΔA标准管×V样)÷V样=400×ΔA测定管÷ΔA标准管

C标准液：标准液的浓度，400μmol/L=400nmol/mL；V样总：上清液总体积，1.0mL；V样：加入反应体系中上清液体积，0.02mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细胞/细菌数量：以10^4为单位计量，万。

注意事项：

1、试剂三和标准品现配现用，配制好的 4℃保存，3 天内使用完。

2、如果样本初始吸光值大于 1.4，建议将样本用试剂一稀释后进行测定。

实验实例：

1、取 0.1g 山楂加入 1mL 试剂一进行冰浴匀浆。8000g，4℃离心 20min，取上清置冰上，按照测定步骤操作，用微量石英比色皿测得计算 Δ 测定管=A3-A4=1.0228-0.6627=0.3601，ΔA 标准管=A1-A2=0.3660-0.0090=0.3570，按样本质量计算含量得：

AsA 含量(nmol/g 质量) =400×ΔA 测定管÷ΔA 标准管÷W =4035 nmol/g 质量。

相关发表文献：

[1] Zhang J, Yang Q, Yue W, Yang B, Zhou W, Chen L, Huang X, Zhang W, Dong J, Ling J. Seagrass Thalassia hemprichii and associated bacteria co-response to the synergistic stress of ocean warming and ocean acidification. Environ Res. 2023 Nov 1;236(Pt 1):116658. doi: 10.1016/j.envres.2023.116658. Epub 2023 Jul 16. PMID: 37454799.

本产品仅供科学研究使用。请勿用于临床、诊断、食品、化妆品检测等用途。
For research use only. Do not use for clinical, diagnostic, food, cosmetic testing and other purposes.

[2] Ackah S, Bi Y, Xue S, Yakubu S, Han Y, Zong Y, Atuna RA, Prusky D. Post-harvest chitosan treatment suppresses oxidative stress by regulating reactive oxygen species metabolism in wounded apples. Front Plant Sci. 2022 Aug 2;13:959762. doi: 10.3389/fpls.2022.959762. PMID: 35982700; PMCID: PMC9379280.

[3] Sun J, Zhong X, Sun D, Cao X, Yao F, Shi L, Liu Y. Structural characterization of polysaccharides recovered from extraction residue of ginseng root saponins and its fruit nutrition preservation performance. Front Nutr. 2022 Aug 1;9:934927. doi: 10.3389/fnut.2022.934927. PMID: 35978961; PMCID: PMC9376600.

[4] Cheng C, Zhao X, Yang H, Coldea TE, Zhao H. Mechanism of selenite tolerance during barley germination: A combination of tissue selenium metabolism alterations and ascorbate-glutathione cycle modulation. Plant Physiol Biochem. 2023 Dec;205:108189. doi: 10.1016/j.plaphy.2023.108189. Epub 2023 Nov 13. PMID: 37979575.

[5] Wang J, Zhang J, Li J, Dawuda MM, Ali B, Wu Y, Yu J, Tang Z, Lyu J, Xiao X, Hu L, Xie J. Exogenous Application of 5-Aminolevulinic Acid Promotes Coloration and Improves the Quality of Tomato Fruit by Regulating Carotenoid Metabolism. Front Plant Sci. 2021 Jun 9;12:683868. doi: 10.3389/fpls.2021.683868. PMID: 34220904; PMCID: PMC8243651.

参考文献：

[1] GARCHERY C, GEST N, DO P. et al. A diminution in ascorbate oxidase activity affects carbon allocation and improves yield in tomato under water deficit [J]. Plant, Cell & Environment, 2013, 36: 159-175.

[2] Tomoko Y, Mamiko K, Yuka O. et al. Influence of Polyphenol and Ascorbate Oxidases during Cooking Process on the Radical-Scavenging Activity of Vegetables [J]. Food Science and Technology Research, 2003, 9(1): 79-83.

相关系列产品：

BC1250/BC1255　L-半乳糖苷-1,4-内酯脱氢酶（Gal LDH）活性检测试剂盒

BC1260/BC1265　抗坏血酸氧化酶（AAO）活性检测试剂盒

BC0220/BC0225　抗坏血酸过氧化物酶（APX）活性检测试剂盒