

抗坏血酸（AsA）含量检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC1230

规格：50T/48S

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 50 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 50 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 25μL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 瓶	2-8℃保存

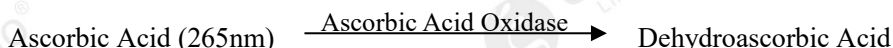
溶液的配制：

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 0.04 mL 上述溶液，加入 0.96 mL 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。



技术指标：

最低检出限：34.725 μmol/L

线性范围：50-1400 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、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰、低温离心机、1 mL 石英比色皿、可调式移液器和蒸馏水。

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 0.1 g 组织，加入 1 mL 试剂一）进行冰浴匀浆。8000g，4℃离心 20 min，取上清置冰上待测。





2、细菌/细胞：按照细胞数量（ 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），冰浴超声波破碎细菌/细胞（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、分光光度计预热30min，调节波长到265nm，蒸馏水调零。

2、试剂二在25℃水浴锅中预热30min。

3、标准管：依次在1mL石英比色皿中加入100μL标准液、800μL试剂二和100μL试剂三，迅速混匀，在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1mL石英比色皿中加入100μL上清液、800μL试剂二和100μL试剂三，迅速混匀，在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900μL工作液、100μL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：

$$\begin{aligned}\text{AsA含量 (nmol/mg prot)} &= (\text{C标准液} \times \Delta A \text{测定管} \div \Delta A \text{标准管} \times V \text{样}) \div (\text{Cpr} \times V \text{样}) \\ &= 400 \times \Delta A \text{测定管} \div \Delta A \text{标准管} \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

2. 按样本质量计算：

$$\begin{aligned}\text{AsA含量(nmol/g 质量)} &= (\text{C标准液} \times \Delta A \text{测定管} \div \Delta A \text{标准管} \times V \text{样}) \div (\text{W} \times V \text{样} \div V \text{样总}) \\ &= 400 \times \Delta A \text{测定管} \div \Delta A \text{标准管} \div \text{W}\end{aligned}$$

3. 按细胞数量计算：

$$\begin{aligned}\text{AsA含量(nmol/10}^4\text{ cell)} &= (\text{C标准液} \times \Delta A \text{测定管} \div \Delta A \text{标准管} \times V \text{样}) \div (\text{细胞数量} \times V \text{样} \div V \text{样总}) \\ &= 400 \times \Delta A \text{测定管} \div \Delta A \text{标准管} \div \text{细胞数量}\end{aligned}$$

4. 按液体体积计算：

$$\text{AsA含量(nmol/mL)} = (\text{C标准液} \times \Delta A \text{测定管} \div \Delta A \text{标准管} \times V \text{样}) \div V \text{样} = 400 \times \Delta A \text{测定管} \div \Delta A \text{标准管}$$

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，0.1mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细胞数量：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 1.3，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，测得计算 ΔA 测定管=A3-A4=1.140-0.763=0.377， ΔA 标准管=A1-A2=0.343-0.012=0.331，按样本质量计算含量得：
 $\text{AsA 含量(nmol/g 质量)} = 400 \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \div \text{W} = 4556 \text{ nmol/g 质量}。$

相关发表文献：

[1] Zhang D, Liu J, Zhang Y, Wang H, Wei S, Zhang X, Zhang D, Ma H, Ding Q, Ma L. Morphophysiological,





proteomic and metabolomic analyses reveal cadmium tolerance mechanism in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Hazard Mater.* 2023 Mar 5;445:130499. doi: 10.1016/j.jhazmat.2022.130499. Epub 2022 Nov 25. PMID: 36455318.

[2] Xiao S, Song W, Xing J, Su A, Zhao Y, Li C, Shi Z, Li Z, Wang S, Zhang R, Pei Y, Chen H, Zhao J. ORF355 confers enhanced salinity stress adaptability to S-type cytoplasmic male sterility maize by modulating the mitochondrial metabolic homeostasis. *J Integr Plant Biol.* 2023 Mar;65(3):656-673. doi: 10.1111/jipb.13382. Epub 2023 Jan 3. PMID: 36223073.

[3] Zhang Z, Zhang Y, Yuan L, Zhou F, Gao Y, Kang Z, Li T, Hu X. Exogenous 5-aminolevulinic acid alleviates low-temperature injury by regulating glutathione metabolism and 尾-alanine metabolism in tomato seedling roots. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2022 Oct 15;245:114112. doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.114112. Epub 2022 Sep 22. PMID: 36155340.

[4] Lu T, Zhu L, Liang Y, Wang F, Cao A, Xie S, Chen X, Shen H, Wang B, Hu M, Li R, Jin X, Li H. Comparative Proteomic Analysis Reveals the Ascorbate Peroxidase-Mediated Plant Resistance to *Verticillium dahliae* in *Gossypium barbadense*. *Front Plant Sci.* 2022 May 19;13:877146. doi: 10.3389/fpls.2022.877146. PMID: 35665163; PMCID: PMC9161280.

[5] Li Y, Niu L, Zhou X, Liu H, Tai F, Wang W. Modifying the Expression of Cysteine Protease Gene PCP Affects Pollen Development, Germination and Plant Drought Tolerance in Maize. *Int J Mol Sci.* 2023 Apr 17;24(8):7406. doi: 10.3390/ijms24087406. PMID: 37108569; PMCID: PMC10138719.

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

