

抗坏血酸/总抗坏血酸 (AsA/T-AsA) 含量检测试剂盒 (比色法)

(可见分光光度法)

产品货号: BA1912

产品规格: 50T/24S

产品简介:

抗坏血酸 (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。脱氢抗坏血酸 (DHA) 是AsA的可逆的氧化型, 在生物体内, 与抗坏血酸共同组成氧化还原系统, 具有电子受体作用。 AsA具有还原性, 能将 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} , Fe^{2+} 与2,2'-联吡啶形成粉红色络合物, 在525nm处有特征性吸收峰。 DTT可还原DHA生成AsA, 可用于检测样本总抗坏血酸 (AsA+DHA) 含量。

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。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品组成:

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体40mL×1瓶	2-8℃
试剂一	粉剂×1瓶	-20℃
试剂二	液体20mL×1瓶	2-8℃
试剂三	液体3mL×1瓶	2-8℃
试剂四	液体30mL×1瓶	2-8℃
试剂五	液体20mL×1瓶	2-8℃
试剂六	粉剂×1瓶	2-8℃
试剂七	液体12mL×1瓶	2-8℃
标准品	粉剂×1支	2-8℃

溶液的配制:

1. 试剂一: 临用前加入3.3mL蒸馏水充分溶解待用, 用不完的试剂-20℃分装避光保存。
2. 试剂六: 临用前加入12mL 70%乙醇 (V/V) 溶液溶解。
3. 标准品: 临用前配制, 加入1.136mL提取液充分溶解; 吸取0.01mL上述溶液, 加入0.99mL提取液, 混匀, 即500nmol/mL AsA标准溶液。

需自备的仪器和用品:

研钵/匀浆器、冰、低温离心机、可见分光光度计、1mL玻璃比色皿、可调式移液器、乙醇和蒸馏水。

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): 提取液体积 (mL) 为1: 5~10的比例 (建议称取约0.1 g组织, 加入1mL提取液) 进行冰浴匀浆。13000g, 4℃离心10min, 取上清置冰上待测。
2. 细胞或细菌: 按照细胞数量 (10^4 个): 提取液体积 (mL) 为500~1000 : 1的比例 (建议500万细胞加入1mL提取液), 冰浴超声波破碎细胞 (功率300W, 超声3秒, 间隔7秒, 总时间3min); 13000g, 4℃离心10min,



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

取上清液置冰上混匀待测。

3. 血清等液体：取500 μ L样本，加入500 μ L提取液，漩涡混匀。13000g，4 $^{\circ}$ C离心10min，取上清置冰上待测。

二、测定步骤

1. 分光光度计预热30min，调节波长到525nm，蒸馏水调零。
2. AsA含量测定

AsA含量测定操作表，按照操作表加入下列试剂：

试剂名称 (μ L)	测定管	对照管	空白管1	空白管2	标准管
样本	50	50	-	-	-
提取液	-	-	-	50	50
标准溶液	-	-	-	-	50
试剂二	200	200	200	200	200
试剂四	250	250	250	250	250
试剂五	200	200	200	200	200
试剂六	200	-	200	-	200
70%乙醇溶液	-	200	-	200	-
试剂七	100	100	100	100	100

混匀，42 $^{\circ}$ C水浴准确反应40min，冷水冷却，于525nm处测定吸光值，分别记为A测定管、A对照管、A空白管1、A空白管2及A标准管。计算 ΔA_1 测定管=(A测定管-A对照管)-(A空白管1-A空白管2)、 ΔA_1 标准管=A标准管-A空白管1。

注意：加入试剂七时将枪头伸入液面以下加入，不可悬空滴加，否则会导致液体浑浊。空白管1、空白管2及标准管只需测定1-2次。

3. T-AsA含量测定

T-AsA含量测定操作表，按照操作表加入下列试剂：

试剂名称 (μ L)	测定管	对照管	空白管1	空白管2	标准管
样本	50	50	-	-	-
提取液	-	-	50	50	-
标准溶液	-	-	-	-	50
试剂一	50	50	50	50	50
试剂二	100	100	100	100	100
混匀，42 $^{\circ}$ C水浴反应15min。					
试剂三	50	50	50	50	50
混匀，室温静置1min。					
试剂四	250	250	250	250	250
试剂五	200	200	200	200	200
试剂六	200	-	200	-	200
70%乙醇溶液	-	200	-	200	-
试剂七	100	100	100	100	100

混匀，42 $^{\circ}$ C水浴准确反应40min，冷水冷却，于525nm处测定吸光值，分别记为A测定管、A对照管、A空白管1、A空白管2及A标准管。计算 ΔA_2 测定管=(A测定管-A对照管)-(A空白管1-A空白管2)、 ΔA_2 标准管=A标准管-A空白管1。

注意：加入试剂七时将枪头伸入液面以下加入，不可悬空滴加，否则会导致液体浑浊。空白管1、空白管2及标准管只需测定1-2次。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

三、AsA /T-AsA含量计算公式

a、AsA 含量计算

(1) 按样本质量计算

$$\text{AsA}(\text{nmol/g 质量}) = (\text{C标准液} \times \Delta\text{A1测定管} \div \Delta\text{A1标准管} \times \text{V样}) \div (\text{W} \times \text{V样} \div \text{V样总}) \\ = 500 \times \Delta\text{A1测定管} \div \Delta\text{A1标准管} \div \text{W}$$

(2) 按细胞数量计算

$$\text{AsA}(\text{nmol}/10^4\text{cell}) = (\text{C标准液} \times \Delta\text{A1测定管} \div \Delta\text{A1标准管} \times \text{V样}) \div (\text{细胞数量} \times \text{V样} \div \text{V样总}) \\ = 500 \times \Delta\text{A1测定管} \div \Delta\text{A1标准管} \div \text{细胞数量}$$

(3) 按液体体积计算

$$\text{AsA}(\text{nmol/mL}) = \text{C标准液} \times \Delta\text{A1测定管} \div \Delta\text{A1标准管} \times 2 = 1000 \times \Delta\text{A1测定管} \div \Delta\text{A1标准管}$$

C标准液：标准品的浓度，500nmol/mL；V样总：提取离心后上清液体积，1.0mL；V样：加入反应体系中上清液体积，0.05mL；W：样本质量，g；2：稀释倍数，（500μL液体+500μL提取液）÷500μL液体=2。

b、T-AsA含量计算

(1) 按样本质量计算

$$\text{T-AsA}(\text{nmol/g 质量}) = (\text{C标准液} \times \Delta\text{A2测定管} \div \Delta\text{A2标准管} \times \text{V样}) \div (\text{W} \times \text{V样} \div \text{V样总}) \\ = 500 \times \Delta\text{A2测定管} \div \Delta\text{A2标准管} \div \text{W}$$

(2) 按细胞数量计算

$$\text{T-AsA}(\text{nmol}/10^4\text{cell}) = (\text{C标准液} \times \Delta\text{A2测定管} \div \Delta\text{A2标准管} \times \text{V样}) \div (\text{细胞数量} \times \text{V样} \div \text{V样总}) \\ = 500 \times \Delta\text{A2测定管} \div \Delta\text{A2标准管} \div \text{细胞数量}$$

(3) 按液体体积计算

$$\text{T-AsA}(\text{nmol/mL}) = \text{C标准液} \times \Delta\text{A2测定管} \div \Delta\text{A2标准管} \times 2 = 1000 \times \Delta\text{A2测定管} \div \Delta\text{A2标准管}$$

C标准液：标准品的浓度，500nmol/mL；V样总：提取离心后上清液体积，1.0mL；V样：加入反应体系中上清液体积，0.05mL；W：样本质量，g；2：稀释倍数，（500μL液体+500μL提取液）÷500μL液体=2。

c、DHA含量计算

$$\text{DHA含量} = \text{T-AsA含量} - \text{AsA含量}$$

(1) 按样本质量计算

$$\text{DHA}(\text{nmol/g 质量}) = 500 \times (\Delta\text{A2测定管} \div \Delta\text{A2标准管} - \Delta\text{A1测定管} \div \Delta\text{A1标准管}) \div \text{W}$$

(2) 按细胞数量计算

$$\text{DHA}(\text{nmol}/10^4\text{cell}) = 500 \times (\Delta\text{A2测定管} \div \Delta\text{A2标准管} - \Delta\text{A1测定管} \div \Delta\text{A1标准管}) \div \text{细胞数量}$$

(3) 按液体体积计算

$$\text{DHA}(\text{nmol/mL}) = 1000 \times (\Delta\text{A2测定管} \div \Delta\text{A2标准管} - \Delta\text{A1测定管} \div \Delta\text{A1标准管})$$

注意事项：

1. 加入试剂七时将枪头伸入液面以下加入，不可悬空滴加，否则会导致液体浑浊。
2. 空白管1、空白管2及标准管只需测定1-2次。
3. A大于1时，建议将样本用提取液稀释后再进行测定，并在计算时乘以相应的稀释倍数。
4. 本试剂盒可单独用于检测样本中AsA或T-AsA含量，也可在同时检测AsA与T-AsA含量后计算DHA含量。
5. 样本提取后当天检测。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com