

总抗坏血酸（TAA）含量测定试剂盒说明书

（货号：ADS-F-VC008 分光法 48 样）

一、指标介绍：

总抗坏血酸（TAA）包括还原型和脱氢型抗坏血酸，其中脱氢抗坏血酸被还原为还原型抗坏血酸，接着还原型抗坏血酸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，继而计算得出总抗坏血酸的含量。

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 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂 a	液体 2.5mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂 b	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂 c	液体 5mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	A: 液体×1 支 试剂瓶 B(空瓶)	4℃保存	试剂二 B 液配制： 1. 临用前取 0.024mL A 液至试剂瓶 B 中，再加 4.976mL 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 10mL 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. 用前甩几下标准品管，使粉剂落入底部，再加入 1mL 试剂一混匀溶解，即得 5mg/mL； 2. 再用试剂一稀释 500 倍（1:499）为 0.01mg/mL 溶液即为 标准液（现配现用） ； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

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）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、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。

2、检测步骤：

- ① 可见分光光度计预热 30 min，调节波长到 534nm，蒸馏水调零。
- ② 取 0.1mL 上清液至新 EP 管中，加入 0.05mL 试剂 a 混匀，接着加入 0.4mL 试剂 b 混匀，（此时整体液体为中性:PH 为 7-8），室温（25℃）下反应 10min，之后再加 0.1mL 试剂 c 混匀（此时整体液体为酸性:PH 为 1-2），此混合液为 TAA 待检液。
- 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)
TAA 待检液	300		
标准液		300	
提取液			300
试剂一	150	150	150
无水乙醇	150	150	150
试剂二 B 液	75	75	75
试剂三	150	150	150
试剂四	75	75	75
混匀，于 30℃ 反应 60min 后，立即取全部澄清液体（若有沉淀需 8000rpm，室温离心 5min，取上清液）至 1mL 玻璃比色皿中，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 300μL 样本+200μL 试剂一+200μL 无水乙醇+100μL 试剂二 B 液+300μL 无水乙醇，30℃ 反应 60min 后，剩余步骤同测定管， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。
- 2.若测定管大于 1.8，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 0.45mL，则试剂一减至 0mL；或增至 0.6mL，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

$$\text{TAA (mg/g 鲜重)} = [(A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})] \times (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \div (W \times V1 \div V) \times 6.5 \times D$$

$$= 0.01 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D$$

2、按液体体积计算

$$\text{TAA (mg/mL)} = [(A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})] \times (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \div V1 \times 6.5 \times D$$

$$= 0.01 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

3、按蛋白浓度计算

$$\text{TAA (mg/mg prot)} = [(A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})] \times (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \div (C_{\text{pr}} \times V1 \div V) \times 6.5 \times D$$

$$= 0.01 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}} \times D$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1--- TAA 待检液体积，0.3mL；

V 标准---加入标准液体积，0.3mL；

C 标准---标准液浓度，0.01mg/mL；

