

脱氢抗坏血酸（DHA）含量测定试剂盒说明书

（货号：ADS-W-VC002-96 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

脱氢抗坏血酸被还原为还原型抗坏血酸，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，继而计算得出样本中总抗坏血酸的含量；再通过直接检测样本得到还原型抗坏血酸含量。总抗坏血酸含量减去还原型抗坏血酸含量即为样本中脱氢抗坏血酸含量。

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 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂 a	液体 5mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂 b	液体 40mL×1 瓶	4℃保存	
试剂 c	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 30mL×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. 临用前取出 0.094mLA 液至试剂瓶 B 中，再加 19.906mL 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 22mL 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 15mL×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） 。

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）、96 孔板、离心管、酶标仪、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, 置冰上待检。

【注】: 若增加样本, 可按照组织质量 (g): 试剂一体积(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 酶标仪预热 30 min, 调节波长到 534nm。

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), 此混合液为总抗坏血酸即 TAA 待检液。

③ 依次在 EP 管中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管 1	测定管 2	标准管 (仅做一次)	空白管 (仅做一次)
上清液	200			
TAA 待检液		200		
标准液			200	
提取液				200
试剂一	100	100	100	100
无水乙醇	100	100	100	100
试剂二 B 液	50	50	50	50
试剂三	100	100	100	100
试剂四	50	50	50	50
混匀, 于 30℃反应 60min 后, 立即取出 200μL 澄清液体 (若有沉淀需 8000rpm, 室温离心 5min, 取上清液) 至 96 孔板中, 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 200μL 各待检液体样本+100μL 试剂一+100μL 无水乙醇+50μL 试剂二 B 液+150μL 无水乙醇, 30℃反应 60min 后, 剩余步骤同测定管, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}$ 。

2.若各测定管大于 1.5, 可对待检液体用试剂一进行稀释 D, 或降低待检液体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。

五、结果计算:

1、按样本质量计算:

$$\begin{aligned} \text{DHA (mg/g 鲜重)} &= [(A_{\text{测 2}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})] \times (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \div (W \times V1 \div V) \times 6.5 \times D - \\ &\quad [(A_{\text{测 1}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})] \times (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.01 \times [6.5 \times (A_{\text{测 2}} - A_{\text{空白}}) \times D - (A_{\text{测 1}} - A_{\text{空白}}) \times D] \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \end{aligned}$$

2、按液体体积计算:

$$\begin{aligned} \text{DHA (mg/mL)} &= [(A_{\text{测 2}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})] \times (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \div V1 \times 6.5 \times D - [(A_{\text{测 1}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})] \times (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \\ &= 0.01 \times [6.5 \times (A_{\text{测 2}} - A_{\text{空白}}) \times D - (A_{\text{测 1}} - A_{\text{空白}}) \times D] \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D \end{aligned}$$

3、按蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{DHA (mg/mg prot)} &= [(A_{\text{测 2}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})] \times (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \div (C_{\text{pr}} \times V1 \div V) \times 6.5 \times D - \\ &\quad [(A_{\text{测 1}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})] \times (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \div (C_{\text{pr}} \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.01 \times [6.5 \times (A_{\text{测 2}} - A_{\text{空白}}) \times D - (A_{\text{测 1}} - A_{\text{空白}}) \times D] \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

V---加入提取液体积, 1 mL; V1--- 各待检液样本体积, 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;
W---样品质量 (g) ; D---稀释倍数, 若没有稀释即为 1;
Cpr---蛋白浓度 (mg/mL) ; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

