总抗坏血酸（TAA）含量测定试剂盒说明书

(货号：ADS-W-VC009　微板法 96 样 有效期：6 个月)

一、指标介绍：

总抗坏血酸（TAA）包括还原型和脱氢型抗坏血酸,其中还原型抗坏血酸易被氧化为脱氢型抗坏血酸，后者与 2，4－二硝基苯肼作用生成可溶于硫酸的红色脎，该红色物质在 520nm 下有最大吸收峰，进而计算得到总抗坏血酸（TAA）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 110mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 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 15ml 的 25%硫酸，混匀，4℃保存。
标准品	粉剂 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

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、**浓硫酸**、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 0.3g 组织(水分充足的样本取约 0.5g 组织)，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。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：

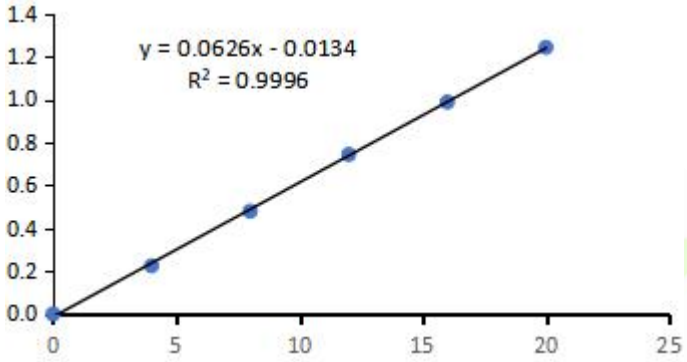
① 酶标仪预热 30 min，调节波长到 520 nm。

② 依次在 96 孔板中或 EP 管中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管	对照管
样本	20	20
试剂一	60	
38℃（恒温培养箱，若用 96 孔板，则需用板子或保鲜膜遮盖，防止水分蒸发），孵育 3 小时		
试剂一		60
85%硫酸 （务必在冰上缓慢加入）	140	140
混匀，室温 25℃静置 20min（准确时间）。液体全部转移至 96 孔板中，于 520nm 处分别读取 A 值， ΔA=A 测定-A 对照（每个测定管需要一个对照管）		

五、结果计算：

1、标准曲线方程：y = 0.0626x - 0.0134，x 是标准品 VC 质量（μg），y 是ΔA。



2、 按蛋白浓度计算

TAA(μg/mg prot) =[(△A+0.0134) ÷0.0626]÷（Cpr×V1）×D=798.7×(△A+0.0134)÷Cpr×D

3、按样本质量计算

TAA (μg /g 鲜重) =[(△A+0.0134) ÷0.0626]÷(W×V1÷V) ×D = 798.7×(△A+0.0134)÷W×D

4、按液体体积计算

TAA (μg /mL) =[(△A+0.0134) ÷0.0626]÷V1×D =798.7×(△A+0.0134) ×D

V----加入提取液体积，1 mL；

V1----加入反应体系中上清液体积，0.02mL;

Cpr----上清液蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

W----样品质量（g）；

D----稀释倍数，若没有稀释即为 1。

附：标准曲线制作过程：

1 向标准品中加入 1mL 蒸馏水，充分溶解，（母液需在两天内用且-20℃保存），标准品母液浓度为 1mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

标品浓度 mg/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称（μL）	标准管	0 浓度管（仅做一次）
标品	20	
蒸馏水		20
试剂一	60	60
38℃（恒温培养箱，若用 96 孔板，则需用板子或保鲜膜遮盖，		

防止水分蒸发），孵育 3 小时。		
85%硫酸 （务必在冰上缓慢加入）	140	140
混匀，室温 25℃静置 20min（准确时间）。液体全部转移至 96 孔板中，于 520nm 处读取 A 值，△A=A 测定-0 浓度管。		