总抗坏血酸（TAA）含量测定试剂盒说明书

（货号：ADS-F-VC009　分光法 48 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 60mL×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 25ml 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）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、**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：

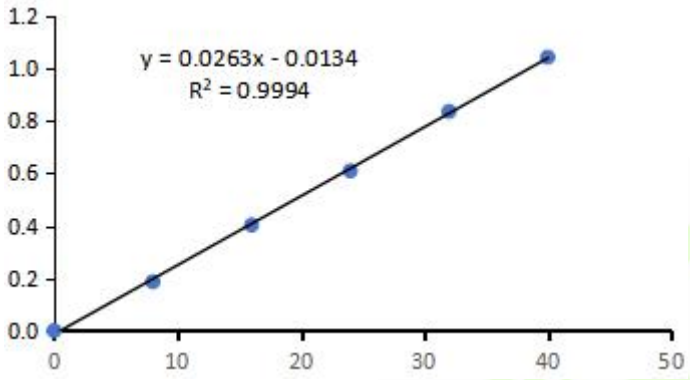
① 分光光度计预热 30 min，调节波长到 520 nm，蒸馏水调零。

② 依次在 EP 管中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管	对照管
样本	80	80
试剂一	240	
38℃（恒温培养箱或水浴锅），孵育 3 小时		
试剂一		240
85%硫酸 （务必在冰上缓慢加入）	560	560
混匀，室温 25℃静置 20min（准确时间）。液体全部转移至 1mL 玻璃比色皿中，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=0.0263x-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) ÷0.0263]÷（Cpr×V1）×D=475.3×(△A+0.0134)÷Cpr×D

3、按样本质量计算

TAA (μg /g 鲜重) =[(△A+0.0134) ÷0.0263]÷(W×V1÷V) ×D = 475.3×(△A+0.0134)÷W×D

4、按液体体积计算

TAA (μg /mL) =[(△A+0.0134) ÷0.0263]÷V1×D =475.3×(△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，0.08mL；

W----样品质量（g）；

D----稀释倍数，若没有稀释即为 1；

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。

附：标准曲线制作过程：

1 向标准品中加入 2mL 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 0.5mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5. 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	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
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	80	
蒸馏水		80
试剂一	240	240

38℃（恒温培养箱或水浴锅），孵育 3 小时		
85%硫酸 （务必在冰上缓慢加入）	560	560
混匀，室温 25℃静置 20min（准确时间）。液体全部转移至 1mL 玻璃比色皿中，于 520nm 处分别读取 A 值， △A=A 测定-0 浓度管。		