

总抗坏血酸(TAA)含量测定试剂盒(2,4-二硝基苯肼法)

分光法 48 样

产品简介:

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。

试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 mg×1 瓶	4°C保存	用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部,再加入 25ml 的 25%硫酸,混匀,4°C保存。
标准品	粉剂 mg×1 支	4°C保存	若重新做标曲,则用到该试剂。

所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、浓硫酸、研钵冰、低温离心机、可调式移液器。

总抗坏血酸 (TAA) 含量测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

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°C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、上机检测：

① 可见分光光度计预热 30 min，调节波长到 520 nm，蒸馏水调零。

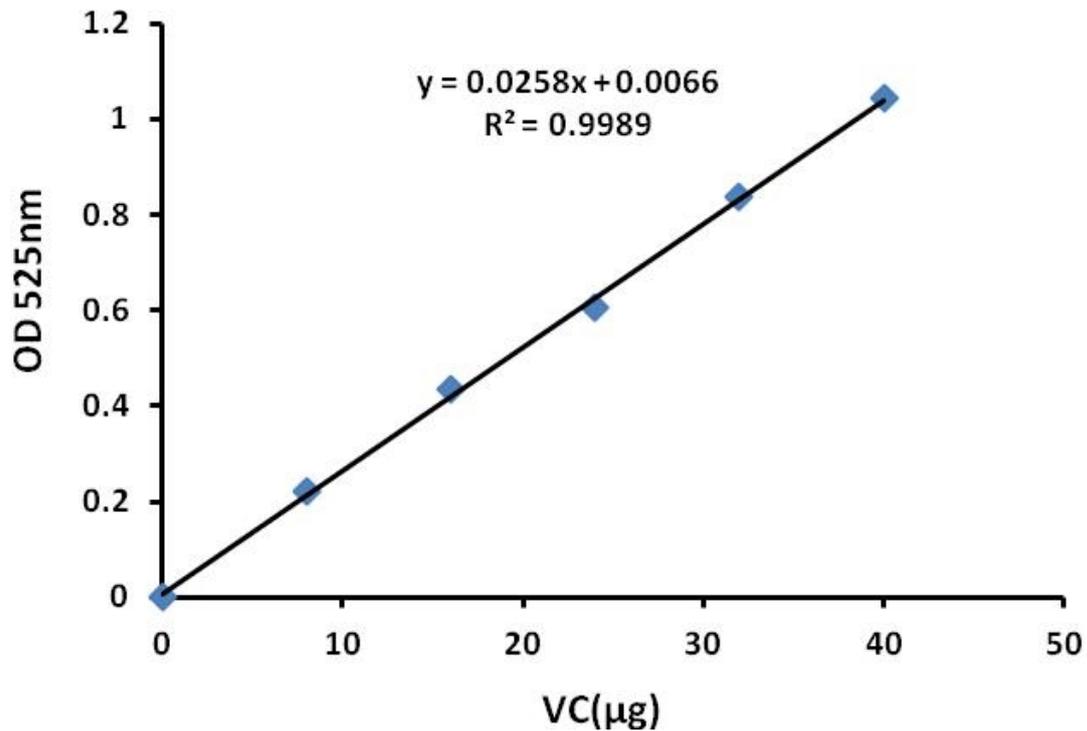
② 依次在 EP 管中依次加入：

试剂名称 (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， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个测定管需要一个对照管)。		

结果计算：

1、标准曲线方程：

$y = 0.0258x + 0.0066$, x 是标准品 VC 质量 (μg), y 是 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算:

$$\text{TAA } (\mu\text{g}/\text{mg prot}) = [(\Delta A - 0.0066) \div 0.0258] \div (\text{Cpr} \times V1) \times D = 484.5 \times (\Delta A - 0.0066) \div \text{Cpr} \times D$$

3、按样本质量计算:

$$\text{TAA } (\mu\text{g} / \text{g 鲜重}) = [(\Delta A - 0.0066) \div 0.0258] \div (W \times V1 \div V) \times D = 484.5 \times (\Delta A - 0.0066) \div W \times D$$

4、按液体体积计算:

$$\text{TAA } (\mu\text{g} / \text{mL}) = [(\Delta A - 0.0066) \div 0.0258] \div V1 \times D = 484.5 \times (\Delta A - 0.0066) \times D$$

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;

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. 制备标准品母液 (0.5mg/mL)：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)。
2. 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5. mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
3. 依据测定管 1 的加样体系操作，根据结果即可制作标准曲线。