

总抗坏血酸(TAA)含量测定(2,4-二硝基苯肼法)

(微板法 96 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 110mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×1 瓶	4℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部,再加入 15ml 的 25%硫酸,混匀,4℃保存。
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲,则用到该试剂。

所需仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、浓硫酸、研钵冰、低温离心机、可调式移液器和蒸馏水。

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℃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:

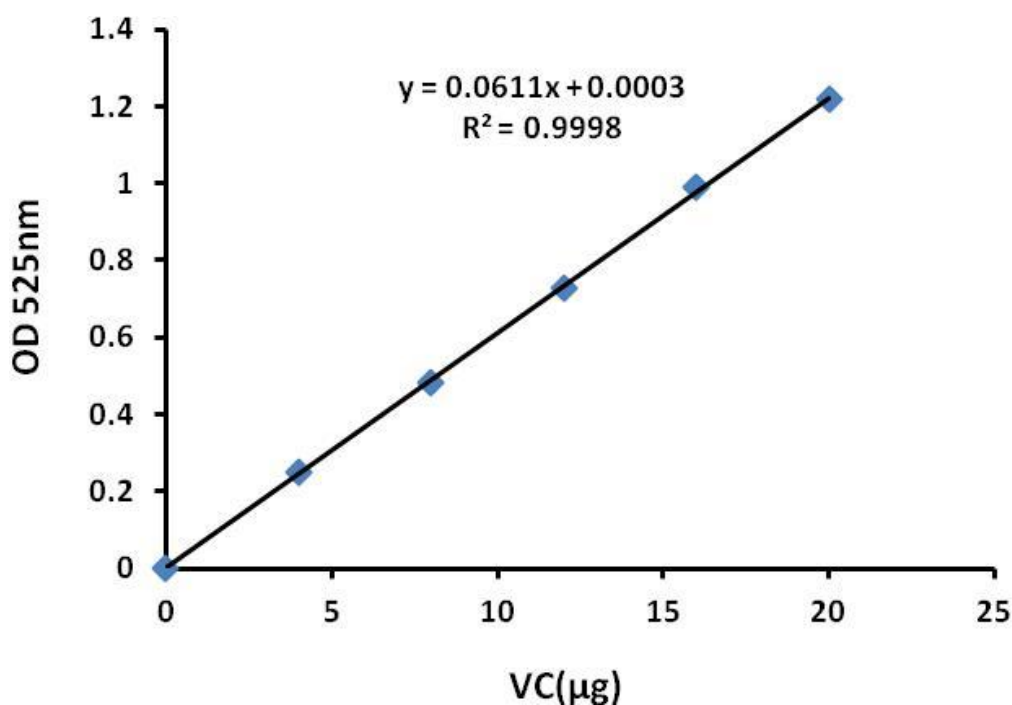
① 酶标仪预热 30 min, 调节波长到 520 nm。

② 依次在 96 孔板中或 EP 管中依次加入:

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

结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.0611x + 0.0003$, x 是标准品 VC 质量 (μg), y 是 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算

$$\text{TAA}(\mu\text{g}/\text{mg prot}) = [(\Delta A - 0.0003) \div 0.0611] \div (\text{Cpr} \times V1) \times D = 818 \times (\Delta A - 0.0003) \div \text{Cpr} \times D$$

3、按样本质量计算

$$\text{TAA}(\mu\text{g}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A - 0.0003) \div 0.0611] \div (W \times V1 \div V) \times D = 818 \times (\Delta A - 0.0003) \div W \times D$$

4、按液体体积计算

$$\text{TAA}(\mu\text{g}/\text{mL}) = [(\Delta A - 0.0003) \div 0.0611] \div V1 \times D = 818 \times (\Delta A - 0.0003) \times D$$

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；

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 制备标准品母液 (1mg/mL) : 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) 。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的加样体系操作, 根据结果即可制作标准曲线。