



总抗坏血酸(TAA)含量测定（2,4-二硝基苯肼法）

微板法

货号: R45173-96S

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, 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。

试剂盒的组成和配制:

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。

所需的仪器和用品:

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:

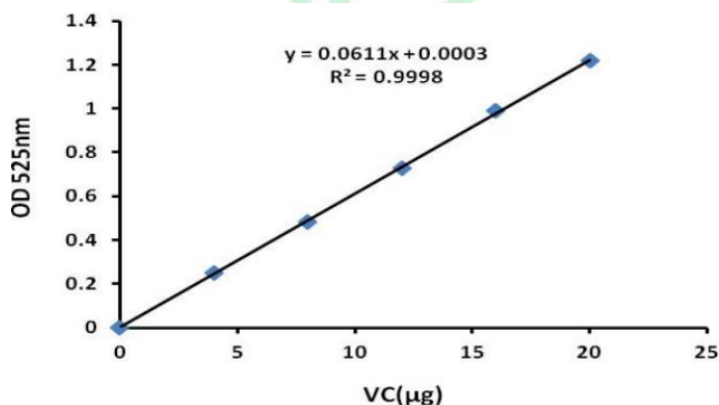
①酶标仪预热30 min, 调节波长到520 nm。

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

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

3、按样本质量计算

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

4、按液体体积计算



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

V----加入提取液体积, 1mL;

V1-----加入反应体系中上清液体积, 0.02mL;

Cpr-----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。

源叶