

## 抗坏血酸检测试剂盒 (100T)

### 说明

抗坏血酸，也称为维生素 C，是由植物和一些动物物种（不包括人类和其他灵长类动物）产生的六碳内酯。抗坏血酸可作为多种酶的酶促辅助因子，可用作单加氧酶和双加氧酶的电子供体。抗坏血酸还起到强力抗氧化剂的作用，特别是对活性氧。本公司的产品为测定抗坏血酸提供了一种简便、直接、高通量的检测方法，该方法利用抗坏血酸与抗坏血酸氧化酶反应生成  $H_2O_2$ 。 $H_2O_2$  与一种特殊的显色剂反应形成一种粉红色产物，其吸光强度（570nm）或荧光强度（530/585nm）直接与样品中的抗坏血酸浓度成正比。线性检测范围：比色法 6~1000  $\mu M$ ，荧光法 1~100 $\mu M$  抗坏血酸。

### 适用范围

直接检测生物样品如血清、血浆、尿液、组织和细胞培养物的抗坏血酸浓度。

### 试剂盒组成与保存

缓冲液：10 mL	-20°C 保存
酶试剂：120 $\mu L$	-20°C 保存
显色剂：120 $\mu L$	-20°C 保存
标准液：400 $\mu L$ 10 mM	-20°C 保存

### 比色法检测

注意：已知含巯基的试剂（如 $\beta$ -巯基乙醇，二硫苏糖醇 $> 5\mu M$ ）可干扰这项检测，样品制备过程中应避免使用。

样品处理：液体样品如血清和血浆可直接检测。组织和细胞（ $10^6\sim 10^7$ ）提取物则用预冷的1 x PBS 溶液均浆并以14,000rpm的转速离心5分钟制备而成。取上层清液用于检测。对于乳汁样品，用100 $\mu L$  6N HCl 与600 $\mu L$ 乳汁混合，以14,000rpm的转速离心5分钟。将300 $\mu L$ 上清液移至一洁净试管内，用50 $\mu L$  6N NaOH中和。将中和后的上层清液用于检测（稀释系数 $n = 1.36$ ）。

1. 将所有试剂放置至室温。打开试管前先短暂离心，检测过程中将已解冻的试管始终置于冰上。
2. 标准品：将 22 $\mu L$  10 mM 标准液与 198 $\mu L$  蒸馏水混合（最终浓度为 1000  $\mu M$ ）。用  $H_2O$  稀释标准品，比例如下：

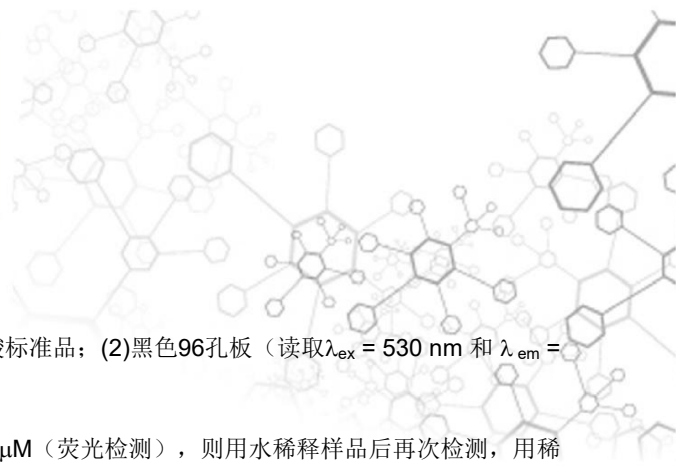
标号	1000 $\mu M$ 标准液+ $H_2O$	体积 ( $\mu L$ )	( $\mu M$ )
1	100 $\mu L$ + 0 $\mu L$	100	1000
2	60 $\mu L$ + 40 $\mu L$	100	600
3	30 $\mu L$ + 70 $\mu L$	100	300
4	0 $\mu L$ +100 $\mu L$	100	0

将 20  $\mu L$  稀释后的标准品移至透明平底96孔板的各个孔内。

样品：将每份样品各20  $\mu L$ 移至孔板的各个孔内。

3. 显色反应：按下列比例配制足够的反应试剂，对于每个反应孔，将85  $\mu L$ 缓冲液、1  $\mu L$ 酶试剂和1  $\mu L$ 显色剂混合。向每孔加入80  $\mu L$ 反应试剂，轻轻振荡混匀，室温下培养10分钟。
4. 读取570nm波长处的吸光度。





KHXS100

### 荧光法检测

荧光检测的步骤与比色检测相似，但须使用(1) 0、30、60和100 $\mu$ M抗坏血酸标准品；(2)黑色96孔板（读取 $\lambda_{ex} = 530 \text{ nm}$ 和 $\lambda_{em} = 585 \text{ nm}$ 下的荧光强度）。

注意：如果计算出的样品中抗坏血酸浓度大于 1000  $\mu$ M（比色检测）或100  $\mu$ M（荧光检测），则用水稀释样品后再次检测，用稀释系数 $n$ 乘以结果。

### 浓度计算

从标准品的测值中减去空白对照品的测值（标号4），绘制 $\Delta OD$ 或 $\Delta F$ 与标准浓度的曲线。测定斜率(Slope)并计算样品中抗坏血酸的浓度：

$$[\text{Ascorbic Acid}] = \frac{R_{\text{样本}} - R_{\text{空白}}}{\text{Slope } (\mu\text{M}^{-1})} \times n \quad (\mu\text{M})$$

$R_{\text{样本}}$ 和  $R_{\text{空白}}$ 分别是样品和 $\text{H}_2\text{O}$ 空白对照品的吸光度或荧光强度读数。 $n$ 是样品稀释系数。

**注意事项：** 本产品仅供研究用，使用过程中应严格遵循实验安全措施。

