Dehydroascorbic acid (DHA) content Kit

脱氢抗坏血酸（DHA）含量测定试剂盒说明书

货号:BN72643| 方法：可见分光法 | 规格：48 样

一、产品简介：

脱氢抗坏血酸被还原为还原型抗坏血酸，还原型抗坏血酸把三价铁离子还原成二价铁离子，二价铁离子与红菲咯啉反应生成红色络和物，在 534nm 处有特征吸收峰，继而计算得出样本中总抗坏血酸的含量；再通过直接检测样本得到还原型抗坏血酸含量。总抗坏血酸含量减去还原型抗坏血酸含量即为样本中脱氢抗坏血酸含量。

二、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 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂 a	液体 2.5mL×1 瓶	4℃保存	
试剂 b	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂 c	液体 5mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	A：液体×1 支 试剂瓶 B(空瓶)	4℃保存	试剂二 B 液配制：临用前取 0.047mLA 液至试剂瓶 B 中，再加 9.953mL 无水乙醇，混匀备用。
试剂三	粉体 mg×1 瓶	4℃保存	用前甩几下使粉体落入底部，再加 18mL 无水乙醇混匀溶解（该试剂难溶，可超声溶解）。
试剂四	液体×1 瓶	4℃保存	溶液为淡黄色。
标准品	粉剂×2 支	4℃保存	临用前：每支用前甩几下标准品管，使粉剂落入底部，再加入 1mL 试剂一混匀溶解，即得 5mg/mL，再用试剂一稀释 500 倍（1:499）为 0.01mg/mL 溶液即为**标准液（现配现用）**。

三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、研钵、冰、低温离心机、**无水乙醇**、可调式移液器和蒸馏水。

四、脱氢抗坏血酸（DHA）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 0.1g 组织(水分充足的果实样本取约 0.5g 组织或更多)，加入 1mL 预先预冷的提取液，进行冰浴匀浆，室温静提 10min 后，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。

③ 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，在 4ºC 或冰浴进行匀浆(使用各类常见电动匀浆器或超声破碎)。4ºC 约 12,000rpm 离心 10min，取上清作为待测样品。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量(10^4):提取液(mL)为 500~1000:1 的比例进行提取。

2、上机检测：

① 可见分光光度计预热 30 min，调节波长到 534nm，蒸馏水调零。

② 取 0.1mL 上清液至新 EP 管中，加入 0.05mL 试剂 a 混匀，接着加入 0.4mL 试剂 b 混匀，（此时整体液体为中性:PH 为 7-8），室温（25℃）下反应 10min，之后再加 0.1mL 试剂 c 混匀（此时整体液体为酸性:PH 为 1-2），此混合液为总抗坏血酸即 TAA 待检液。

③ 依次在 EP 管中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管 1	测定管 2	标准管（仅做一次）	空白管（仅做一次）
上清液	300			
TAA 待检液		300		
标准液			300	
提取液				300
试剂一	150	150	150	150
无水乙醇	150	150	150	150
试剂二 B 液	75	75	75	75
试剂三	150	150	150	150
试剂四	75	75	75	75
混匀，于 30℃反应 60min 后，于 8000rpm 室温离心 5min 后，**立即**取出全部澄清液体至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，**立即**于 534nm 处读取各管吸光值 A。				

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算：

1、按样本质量计算：

DHA (mg/g 鲜重) =[(A 测 2-A 空白) ÷(A 标准-A 空白)] ×(C 标准×V 标准)÷(W×V1÷V) ×6.5×D-[(A 测 1-A 空白) ÷(A 标准-A 空白)] ×(C 标准×V 标准)÷(W×V1÷V)×D

=0.01×[6.5×(A 测 2-A 空白)×D-(A 测 1-A 空白) ×D] ÷(A 标准-A 空白)÷W

2、按液体体积计算：

DHA (mg/mL) =[(A 测 2-A 空白) ÷(A 标准-A 空白)] ×(C 标准×V 标准)÷V1×6.5×D-[(A 测 1-A 空白) ÷(A 标准-A 空白)] ×(C 标准×V 标准)

=0.01×[6.5×(A 测 2-A 空白)×D-(A 测 1-A 空白) ×D]÷(A 标准-A 空白) ×D

3、按细菌/细胞数量计算：

DHA (μg/10^4 cell)={[(A 测 2-A 空白) ÷(A 标准-A 空白)]×(C 标准×V 标准)÷(500×V1÷V)×6.5×D-[(A 测 1-A 空白) ÷(A 标准-A 空白)]×(C 标准×V 标准)÷(500×V1÷V)×D}×10^3

=10×[6.5×(A 测 2-A 空白)×D-(A 测 1-A 空白)×D]÷(A 标准-A 空白)÷500

V---加入提取液体积，1 mL； V1---各待检液样本体积，0.3mL； V 标准---加入标准液体积，0.3mL；

C 标准---标准液浓度，0.01mg/mL； W---样品质量（g）； 6.5---样本上清液的稀释倍数；

500---细胞数量，万； D---稀释倍数，若没有稀释即为 1。