

銅偵稀<sup>®</sup> Measure C-Cu<sup>®</sup>

## 廣域型抗壞血酸濃度檢測套組 (250 assays)

### Ascorbic Acid (Broad Range) Colorimetric Assay Kit

#### 快速使用指引

1. 開封前存放條件：4°C 冷藏保存半年。(抗壞血酸氧化酶保存於-80°C)
2. 吸收光譜儀偵檢波長(nm)：570 nm。
3. 標準液或樣品體積：10  $\mu$ L。
4. 1X 抗壞血酸氧化酶溶液添加量：2  $\mu$ L。(對照組添加 2  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O)。
5. 配置反應溶液呈色劑(A 劑)與硫酸銅溶液(B 劑)體積比例：25:2。
6. 反應溶液添加量：200  $\mu$ L。
7. 反應呈色溫度與時間：室溫 15 分鐘。
8. 抗壞血酸檢測範圍：0~2000  $\mu$ M。

#### 套組介紹

抗壞血酸(Ascorbic acid)是一種生物體內重要的水溶性抗氧化劑，其左式右旋對映異構物(L-enantiomer)通稱為維生素 C (Vitamin C) (圖 1)。抗壞血酸作為還原劑，為所有動植物所需的各種酶促反應和某些非酶促反應提供電子。而其還原能力可作為一種抗氧化劑，迅速清除活性氧(reactive oxygen species, ROS)。抗壞血酸在組織生長、傷口癒合、神經傳導物合成、血液膽固醇含量以及中和自由基等多種生理功能中，扮演重要角色。然而人體無法自行合成維生素 C，必須通過飲食攝入；當飲食攝入不足時，便產生壞血病。而在生物檢體中，同時存在多種例如白蛋白等多種的抗氧化物，因此在定量分析抗壞血酸的檢測方法中，容易受其影響，產生強烈的干擾。本套組提供了一種不受其他抗氧化物影響，且快速、簡單而靈敏的方法，來檢測各種生物檢體(例如：血液、尿液、唾液、淚液、組織液、組織/細胞萃取液以及食品萃取液)中的抗壞血酸含量。

#### 檢測原理

本套組檢測原理基於檢體中抗氧化物的電子提供還原能力，驅動二價銅離子還原成一價亞銅離子，並與套組中的呈色劑反應，於 570 nm 產生強烈的吸收光譜變化，而可對其進行定量測定。本套組利用抗壞血酸氧化酶(ascorbate oxidase, AO)專一性的破壞抗壞血酸，將檢體中抗壞血酸提供的電子還原力與其他抗氧化物區隔。每個待測樣品重覆進行 2 次測定，其中一次用抗壞血酸氧化酶處理(+AO)，而另一次不用(-AO)。最後根據成對樣品的 OD 570 讀值差異( $\Delta$ AO)推算抗壞血酸濃度。本套組僅需微量檢體(10  $\mu$ L)，**抗壞血酸濃度檢測極限(LOD)可達 0.016  $\mu$ M**，因此對生物檢體中的抗壞血酸濃度變化提供了一種實用的分析工具。本套組可使用 96 孔盤，搭配微量孔盤檢測儀(microplate reader)；或是選用 0.5 mL 薄壁離心管，搭配建議之專用光譜儀進行測量，其操作方式請參閱使用步驟。

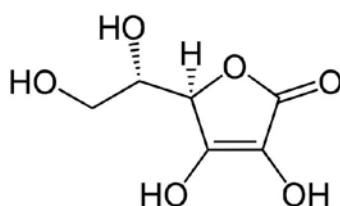


圖 1. 左式右旋抗壞血酸的結構

## 套組內容與試劑準備

1. 呈色劑(A 劑)：50 mL 棕色塑膠瓶\*1，直接使用。
2. 硫酸銅溶液(B 劑)：4 mL 半透明塑膠管\*1，直接使用。
3. 5X Assay buffer(C 劑)：50 mL 白色塑膠瓶\*1，使用前以 ddH<sub>2</sub>O 稀釋成 1X。
4. 抗壞血酸標準品：1 mL 咖啡色尖底塑膠瓶\*1，加入 1 mL ddH<sub>2</sub>O 即得 10X 抗壞血酸標準液(100 mM)。標準品回溶後立即使用或是 100 μL 分裝後凍存於-20°C。
5. 50X 抗壞血酸氧化酶溶液：綠蓋半透明塑膠管\*1，凍存於-80°C。使用前依需要量以 ddH<sub>2</sub>O 稀釋為 1X (例如 50 wells 的分析，取 2 μL 50X 氧化酶以 ddH<sub>2</sub>O 稀釋到 100 μL，限單次使用)。

## 套組運送與保存資訊

組成	運送資訊	包裝開封前保存資訊
1. A 劑：呈色劑	-20 °C 冷凍運送	4 °C 冷藏保存。 正確保存狀況下，可存放半年。
2. B 劑：硫酸銅溶液		
3. C 劑：5X 緩衝溶液		
4. 抗壞血酸標準品		冷凍存於-80°C，可存放半年。
5. 50X 抗壞血酸氧化酶		

注意：抗壞血酸氧化酶必須凍存於-80°C。

## 檢測操作所需但套組內未提供之器材

1. 96 孔微量盤(microplate)
2. 10 kDa 蛋白質離心過濾管(用於高蛋白含量的樣品)
3. 二次蒸餾水(Distillation-Distillation H<sub>2</sub>O, ddH<sub>2</sub>O)
4. 10 μL 至 1000 μL 微量分注器 (micropipettes)
5. 錐形離心管，微量離心管和用於製備樣品和緩衝液的容器
6. 離心機和微量離心機
7. 超音波震盪機或組織均質機
8. 微量盤檢測儀(microplate reader)，能夠讀取 540-600 nm 之間的吸光值

## 檢體前處理

所有檢體應在取樣後立即分析或在-80°C 下保存不超過 2 個月。檢體檢測後，檢測讀值應在標準品的線性可信區間內。高濃度的檢體可能會導致檢測結果被檢體中其他成份干擾，建議在檢測前，可以根據需要以 PBS 稀釋，每次檢測時，皆應使用同批標準液建立標準曲線。

**體液**：將組織液在 4°C 環境下以 12,000 rpm 離心 20 分鐘。提取上清液後，樣品應立即測試或在-80°C 下冷凍。

**血液**：收集血液檢體並添加到以肝素(heparin)\*作為抗凝劑的血液收集管中。在 4°C 下以 3,000 rpm 離心 10-15 分鐘。小心吸取上層黃色血漿上清液。樣品應立即測試或在-80°C 下冷凍。

注意：應避免產生溶血。\*限用肝素做為抗凝劑，EDTA 會干擾呈色反應。

**細胞萃取液**：在 4°C 環境下將 1~2 x 10<sup>6</sup> 細胞/ mL 在 4 倍體積的 1X Assay Buffer (C 劑五倍稀釋液)中透過超音波震盪機處理，或是進行多次凍融循環。在 4°C 下以 12,000 rpm 離心 15 分鐘，然後除去沉澱物。高濃度的蛋白質可能會干擾測定，可用 10 kDa 蛋白質離心過濾管排除蛋白質干擾。完成樣品製備後立即測量，或將其存儲在-80°C。

**組織萃取液**：在 4°C 環境下將約 10 mg 的組織以 1~2 mL 的 1X Assay Buffer (C 劑五倍稀釋

液)進行均質/超音波震盪處理。將均質液在 4°C 下以 12,000 rpm 離心 15 分鐘後收集上清液。高濃度的蛋白質可能會干擾測定，可用 10 kDa 蛋白質離心過濾管排除蛋白質干擾。完成樣品製備後立即測量，或將其存儲在-80°C。

**食物萃取物**：用水沖洗未煮熟的食物(例：水果或蔬菜)，並在 100 mL ddH<sub>2</sub>O 中將 5 克樣品(新鮮重量)均質打碎 30 秒。將均質液在 4°C 下以 12,000 rpm 離心 15 分鐘後收集上清液。提取上清液後，樣品應立即測試或在-80°C 下冷凍。

### 操作步驟

1. 解凍 10X 抗壞血酸標準液(100 mM)，以 1X Assay buffer 稀釋 10 倍。

梯度稀釋抗壞血酸標準液(10 mM)以配置標準曲線(standard curve)。配置可參考下表：

編號	濃度 (mM)	來源 (μL)	1X Assay Buffer (μL)	加總 (μL)	最後體積 (μL)
A	2.5	125 取自標準液	375	500	500
B	2	200 取自標準液	800	1000	1000
C	1.5	150 取自標準液	850	1000	800
D	1	90 取自標準液	810	900	400
E	0.75	200 取自 C 管	200	400	400
F	0.5	500 取自 D 管	500	1000	500
G	0.25	400 取自 F 管	400	800	800
H	0.05	100 取自 F 管	900	1000	1000
I	0 (Blank)	--	500	500	500

2. 配置反應溶液：將呈色劑 (A 劑)與硫酸銅溶液(B 劑)依 25:2 的體積比例混和。(例如：配置反應溶液 27 mL = 硫酸銅溶液 2 mL + 呈色液 25 mL)。
3. 在 96 孔盤中加入梯度濃度之標準液或樣品各 10 μL。(注意：樣品與標準品皆需進行成對檢測，其中一個用抗壞血酸氧化酶處理(+AO 組)，另一個不使用該酶(-AO 組))。
4. 將 2 μL (1X 抗壞血酸氧化酶溶液)添加到(+AO 組)，在(-AO 組)中加入 2 μL ddH<sub>2</sub>O，確保溶液充分混合後在室溫下靜置 15 分鐘。
5. 加入 200 μL 反應溶液，在室溫下避光靜置 15 分鐘。
6. 使用 570 nm 作為主要波長，以微量盤檢測儀上讀取吸光值。確保儀器讀值在測定線性範圍內(0-2.5 OD)，必要時進行樣品稀釋。

## 抗壞血酸濃度計算

1. 將[標準品/Blank]不含抗壞血酸氧化酶之對照組吸光值( $A_{-AO}$ )減去含抗壞血酸氧化酶之實驗組吸光值( $A_{+AO}$ )，其差異即為由抗壞血酸所產生的吸光值( $\Delta AO$ )，將三重覆的  $\Delta AO$  平均值繪製標準曲線(圖 2)。

$$(\Delta AO) = (A_{-AO}) - (A_{+AO})$$

2. 將三重覆樣品的吸光值變化( $\Delta AO$ )平均值與標準曲線進行比較，以推斷樣品中抗壞血酸的含量。

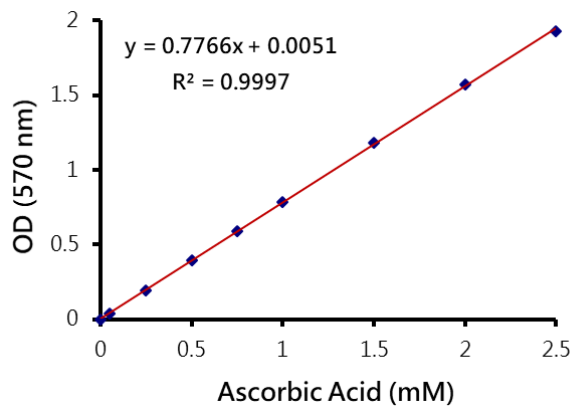


圖 2. 抗壞血酸標準曲線

## 引用文獻

1. Tsao, Yu-Ting, et al., *Bioeng Transl Med.* 2020,6(2), e10199.
2. Tsao, Yu-Ting, et al., *Antioxidants* 2022, 11, 397.

聚創新材料股份有限公司

IMT FORMOSA New Materials Co., Ltd.

電話 Phone: 0926-159317

電郵 Email: [polycreatives@outlook.com](mailto:polycreatives@outlook.com)

聯絡人 Contact: Peter Hsu

