

植物丙二醛(MDA)检测试剂盒(TBA 比色法)说明书

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

产品简介:

动物或植物细胞发生氧化应激(oxidativestress)时，会发生脂质氧化。丙二醛(Malondialdehyde,MDA)是一种生物体脂质氧化的天然产物，一些脂肪酸氧化后逐渐分解为一系列包括MDA在内的复杂化合物，此时通过检测MDA的水平即可检测脂质氧化的水平，因此MDA的测定被广泛用作脂质氧化的指标。生物体内的一些其它生化反应也会产生MDA，例如thromboxanesynthase也可以催化产生，但只要在测定时设置适当对照即可观察到脂质氧化水平的变化。

植物丙二醛(MDA)检测试剂盒(TBA 比色法)(PlantMDAAssayKitwithTBA)又称脂质氧化(MDA)检测试剂盒，是采用一种基于MDA和硫代巴比妥酸(thiobarbituricacid,TBA)反应产生红色产物的显色反应，随后通过比色法用于对植物组织(根、茎、叶、种子等)MDA进行检测，是专门用于植物脂质氧化(lipidperoxidation)水平检测的试剂盒，不适用于动物组织、细胞、血液等；丙二醛在较高温度及酸性环境中可与TBA发生反应，形成红色的MDA-TBA加合物，MDA-TBA加合物在532nm处有最大吸收，该复合物的吸光系数为155mmol/(L.cm)，并且在600nm波长处有最小吸收，植物组织中糖类物质对MDA-TBA反应有干扰，我们总结出经验公式，以消除这一干扰，亦可以通过比标准品进行比较，进行含量检测。该试剂盒仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

名称	规格		保存条件
植物丙二醛(MDA)检测试剂盒	50T	100T	4℃
试剂(A):组织匀浆液	250ml	500ml	RT 避光
试剂(A):TBA	0.35g	0.7g	RT 避光
试剂(C):抗氧化剂	0.5ml	1ml	4℃
试剂(D):MDA 标准品(1mmol/L)	0.5ml	1ml	-20℃避光
使用说明书	1份		
有效期	1年		

自备材料:

- 1、植物根茎、叶子等
- 2、剪刀
- 3、离心管、小试管或96孔板
- 4、分光光度计或酶标仪

5、水浴锅或恒温箱

6、离心机

操作步骤(仅供参考):

1、样本处理:

①制备 MDA 提取液: 取适量的植物根、茎、叶子、种子等, 称量后剪碎, 按每 0.4g 植物样品加入 4ml 的比例加入组织匀浆液, 充分匀浆(一般取 0.4~1g 植物样品即可)。4000g 离心 10min, 取上清液待用, 该上清液即为 MDA 提取液; 如果采用酶标仪检测结果, 应相应减少制备提取液的量, 譬如取 0.2g 植物样品加入 2ml 组织匀浆液。

②样品准备完毕后可以用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度, 以便于后续计算单位蛋白重量植物样品的 MDA 含量; 测定蛋白浓度非必须步骤, 亦可采用经验公式计算。

③该试剂盒对于样品中的常见化学成分的兼容性参考下表:

试剂类别	化学成分	是否干扰
缓冲液	HEPES(100mM)	否
	Borate(50mM)	否
	Phosphate(100mM)	否
	Tris(25mM)	否
去垢剂	CHAPS($\leq 1\%$)	否
	TritonX-100($\leq 1\%$)	否
	Tween20($\leq 1\%$)	否
抑制剂/螯合剂	PMSF($\leq 200 \mu M$)	否
	EDTA($\leq 1mM$)	否
	EGTA ($\leq 1mM$)	否
	Antipain($\leq 100 \mu g/ml$)	否
	Chymostatin($\leq 10 \mu g/ml$)	否
	Leupeptin($\leq 10 \mu g/ml$)	否
	Trypsin($\leq 10 \mu g/ml$)	否
其他	Glycerol($\leq 10\%$)	否
	Sucrose(250mM)	否

2、配制 TBA 工作液: 称取适量 TBA, 用组织匀浆液配制成浓度为 0.68% 的 TBA 工作液, 例如取 0.068g TBA 用 10ml 组织匀浆液配制, 最终浓度即为 0.68% 的 TBA 工作液。TBA 工作液需完全溶解后再使用, 可以加热到 60℃ 促溶, 并可通过反复剧烈 Vortex 促溶; 配制好的 TBA 工作液 4℃ 避光保存, 至少 1 个月内有效。

3、稀释标准品: 如果进行简易快速检测, 标准品直接稀释至 10 μM ; 如果进行精确检测, 取适量标准品用组织匀浆液稀释至 1、2、5、10、20、50 μM ; 如果采用经验公式计算含量, 无需标准品; 配制好的 MDA 标准品 4℃ 避光保存, 至少 3 个月内有效。

4、样品测定:

①分光光度计测定: 在离心管或其它适当容器内加入 1ml 组织匀浆液作为空白对照, 加入 1mlMDA 提取液用于测定, 随后加入 1mlTBA 工作液。可参考下表设置检测反应体系, 依次加入试剂:

加入物质(ml)	空白管	标准管	测定管
组织匀浆液	1	—	—
标准品(可选步骤)	—	1	
MDA 提取液	—	—	1
抗氧化剂	0.005	0.005	0.005
TBA 工作液	1	1	1

②酶标仪测定: 在离心管或其它适当容器内加入 200 μ l 组织匀浆液作为空白对照, 加入 200 μ l MDA 提取液用于测定, 随后加入 200 μ l TBA 工作液。可参考下表设置检测反应体系, 依次加入试剂:

加入物质(μ l)	空白管	标准管	测定管
组织匀浆液	200	—	—
标准品(可选步骤)	—	200	
MDA 提取液	—	—	200
抗氧化剂	1	1	1
TBA 工作液	200	200	200

③混匀,加盖, 95 $^{\circ}$ C 水浴煮沸 30min, 加热时务必注意避免液体暴沸溅出。如果使用加热块 (Heatblock) 进行加热注意用重物压紧离心管盖; 如果使用沸水浴, 则需使用可把盖子锁死的离心管或螺旋盖离心管或用 Parafilm 封住离心管口, 用针头刺一小孔。最方便和准确的加热方法是使用带有热盖并可以加热的金属浴或者 0.5mlPCR 仪。

④冷水浴或流水冷却至室温, 4000g 离心 10min。

⑤取上清, 蒸馏水调零, 用分光光度计或酶标仪测定 532nm 处吸光度, 如果不方便也可以测定 530~540nm 之间的吸光度, 分别记为 A 空白、A 标准、A 测定; 如果采用经验公式计算, 应分别测定 450nm、532nm、600nm 处的吸光度, 分别记为 A450、A532、A600。

计算: 如果进行简易快速检测, 直接以 10 μ M 标准品进行计算, 获得 MDA 的摩尔浓度; 如果采用经验公式, 无需制作标准曲线或测定标准品; 如果需要精确计算, 以 MDA 标准品浓度为横坐标, 以对应的吸光度为纵坐标, 制作标准曲线, 根据标准曲线计算处 MDA 提取液的浓度; 对于固体状组织, 可以通过单位重量的蛋白含量或组织重量等来表示最初样品中的 MDA 含量, 例如 μ mol/mg 蛋白或 μ mol/mg 组织。

简易快速 MDA 含量计算公式:

MDA 含量($\mu\text{mol}/\text{mg}$)=(A 测定-A 空白)/(A 标准-A 空白) \times 标准品浓度/蛋白质质量浓度(mg/ml)

式中: A 测定=待测样品的 532nm 处吸光度

A 标准=标准品的 532nm 处吸光度

A 空白=空白对照的 532nm 处吸光度

标准品浓度=10 μM

蛋白质质量浓度(mg/ml)=BCA 法测定的蛋白浓度(mg/ml)

不采用标准品的经验公式:

MDA 浓度($\mu\text{mol}/\text{L}$)=6.45 \times (A532-A600)-0.56 \times A450

MDA 含量($\mu\text{mol}/\text{mg}$)=MDA 浓度($\mu\text{mol}/\text{L}$) \times MDA 提取液体积(ml)/植物组织鲜重(g)

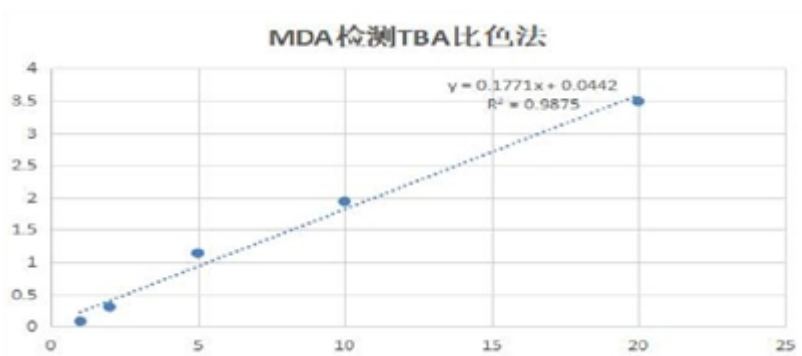
式中: A532=待测样品的 532nm 处吸光度 A600=待测样品的 600nm 处吸光度

A450=待测样品的 450nm 处吸光度

注意事项:

- 1、上述低温试剂避免反复冻融, 以免失效或效率下降。
- 2、如果没有分光光度计, 也可以使用酶标仪测定, 检测样品量会相应增加。
- 3、待测样品尽量新鲜, 提取后应尽快检测, 以免活性下降。
- 4、待测 MDA 提取液如不能及时测定, 应置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 4 天内稳定。

附录: 参考标准曲线范围: 测定 MDA 标准在 10 μM 时, 通过分光光度计测定其吸光度多在 1.4~1.8 之间。测定 MDA 标准在 1、2、5、10、20 μM 时吸光度, 据此作出其标准曲线如下:



注意: 由于检测仪器和操作手法等条件的不同, 参考值范围会有波动, 该值仅供参考, 对于要求精确计算 MDA 含量的, 可以进行多点测定。根据测定经验显示, 标准品浓度在 2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 以下, 标准品浓度在 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 以上, 标准曲线会有偏差。