

植物丙二醛(MDA)检测试剂盒(TBA 比色法)

产品简介：

动物或植物细胞发生氧化应激(oxidative stress)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 thromboxane synthase 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。

Leagene 植物丙二醛(MDA)检测试剂盒(TBA 比色法)(Plant MDA Assay Kit with TBA) 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(thiobarbituric acid, 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(lipid peroxidation)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	编号	TO1023	TO1023	Storage
		50T	100T	
试剂(A): 组织匀浆液		250ml	500ml	RT 避光
试剂(B): TBA		0.35g	0.7g	RT 避光
试剂(C): 抗氧化剂		0.5ml	1ml	-20°C 避光
试剂(D): MDA 标准品(1mmol/L)		0.5ml	1ml	-20°C 避光
使用说明书		1 份		

自备材料：

- 1、植物根茎、叶子等
- 2、剪刀、离心管、小试管或 96 孔板、分光光度计或酶标仪、水浴锅或恒温箱、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)。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
	Triton X-100 ($\leq 1\%$)	否
	Tween 20 ($\leq 1\%$)	否
抑制剂/螯合剂	PMSF ($\leq 200\mu\text{M}$)	否
	EDTA ($\leq 1\text{mM}$)	否
	EGTA ($\leq 1\text{mM}$)	否
	Antipain ($\leq 100\mu\text{g/ml}$)	否
	Chymostatin ($\leq 10\mu\text{g/ml}$)	否
	Leupeptin ($\leq 10\mu\text{g/ml}$)	否
	Trypsin ($\leq 10\mu\text{g/ml}$)	否
其他	Glycerol ($\leq 10\%$)	否
	Sucrose (250mM)	是

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°C 促溶，并可通过反复剧烈 Vortex 促溶。

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°C 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 1ml MDA 提取液用于测定，随后加入 1ml 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(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 200μl 组织匀浆液作为空白对照，加入 200μlMDA 提取液用于测定，随后加入 200μl 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(μl)	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℃水浴煮沸，加热时务必注意避免液体暴沸溅出。如果使用加热块(Heat block)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 0.5ml PCR 仪。

④冷水浴或流水冷却至室温。

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 $A_{\text{空白}}$ 、 $A_{\text{标准}}$ 、 $A_{\text{测定}}$ ；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 A_{450} 、 A_{532} 、 A_{600} 。

计算：

如果进行简易快速检测，直接以 10μM 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 μmol/mg 蛋白或 μmol/mg 组织。

简易快速 MDA 含量计算公式：

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

式中： $A_{\text{测定}}$ = 待测样品的 532nm 处吸光度

$A_{\text{标准}}$ = 标准品的 532nm 处吸光度

$A_{\text{空白}}$ = 空白对照的 532nm 处吸光度

标准品浓度 = 10 μ M

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(μ mol/L) = $6.45 \times (A_{532} - A_{600}) - 0.56 \times A_{450}$

MDA 含量(μ mol/mg) = MDA 浓度(μ mol/L) \times MDA 提取液体积(ml) / 植物组织鲜重(g)

式中： A_{532} = 待测样品的 532nm 处吸光度

A_{600} = 待测样品的 600nm 处吸光度

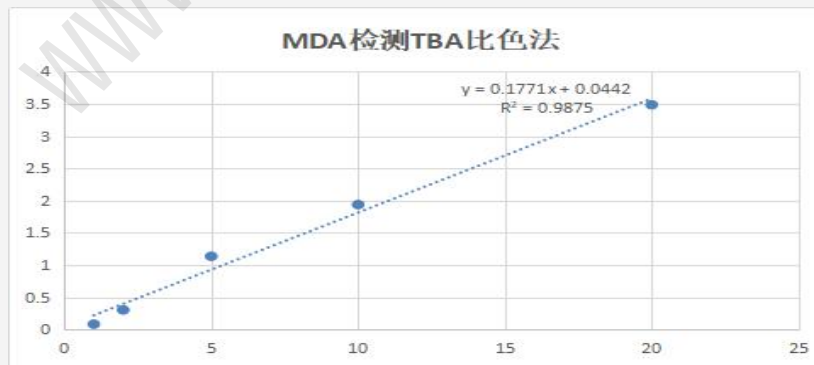
A_{450} = 待测样品的 450nm 处吸光度

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 $^{\circ}$ C 保存，4 天内稳定。
- 5、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 6、试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。

有效期： 12 个月有效。低温运输，按要求保存。

附录： 参考标准曲线范围：Leagene 测定 MDA 标准在 10 μ M 时，通过分光光度计测定其吸光度多在 1.4~1.8 之间。Leagene 测定 MDA 标准在 1、2、5、10、20 μ M 时吸光度，据此 Leagene 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 Leagene 测定经验显示，标准品浓度在 2 μ mol/L 以下，标准品浓度在 50 μ mol/L 以上，标准曲线会有偏差。