北京沃凯生物科技有限公司
全国免费电话:400-819-385
www.bjoka-vip.com
Tel:010-62971590. Fax:62340519
M-ail:postmaster@oka-vip.com

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。

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:

编号 / 名称	GCTO1023 50T	GCTO1023 100T	Storage
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℃ 避光
试剂(D): MDA 标准品(1mmol/L)	0.5ml	1ml	-20℃ 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)。

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 (≤1%)	否
	Triton X-100 (≤1%)	否
	Tween 20 (≤1%)	否
抑制剂/螯合剂	PMSF (≤200μM)	否
	EDTA (≤1mM)	否
	EGTA (≤1mM)	否
	Antipain (≤100μg/ml)	否
	Chymostatin (≤10μg/ml)	否
	Leupeptin (≤10μg/ml)	否
	Trypsin (≤10μg/ml)	否
其他	Glycerol (≤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℃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 10μM；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、50μM；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 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 30min，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，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 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：

MDA 含量(μmol/mg)=$(A_{测定}-A_{空白})/(A_{标准}-A_{空白})$×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=10μM

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(μmol/L)=6.45×(A_{532}-A_{600})-0.56×A_{450}

MDA 含量(μmol/mg)=MDA 浓度(μmol/L)×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。

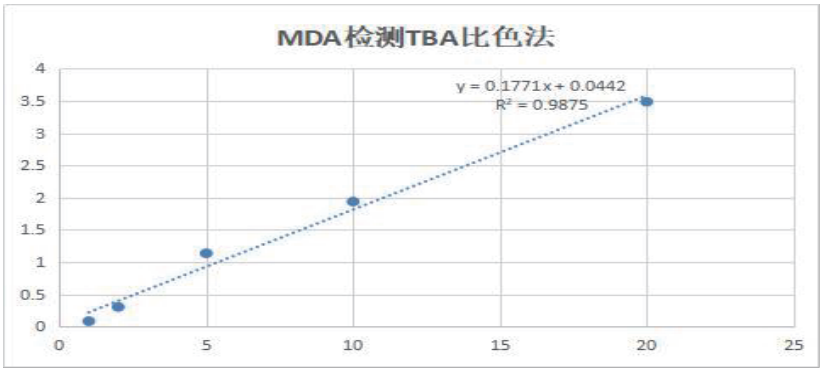
4、 待测 MDA 提取液如不能及时测定，应置于-20℃保存，4 天内稳定。

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：测定 MDA 标准在 10μM 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、20μM 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 2μmol/L 以下，标准品浓度在 50μmol/L 以上，标准曲线会有偏差。