

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)。

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；配制好的 TBA 工作液 4°C 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°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 200 μ l 组织匀浆液作为空白对照，加入 200 μ lMDA 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(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 $A_{\text{空白}}$ 、 $A_{\text{标准}}$ 、 $A_{\text{测定}}$ ；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 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：

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

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

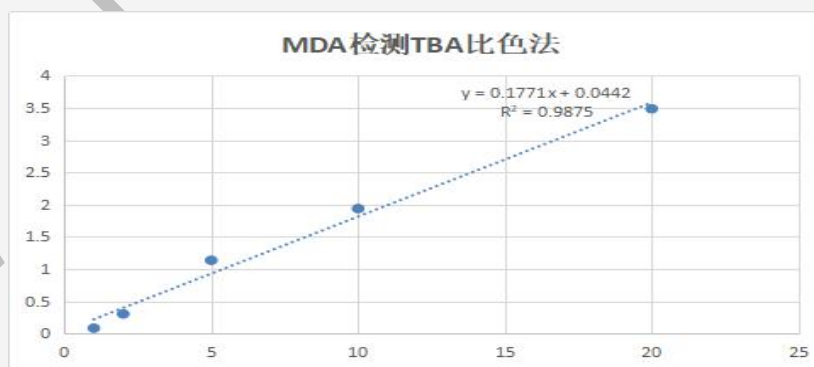
A_{450} = 待测样品的 450nm 处吸光度

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。