

植物丙二醛（MDA）测试盒说明书(精简版)

(货号:A003-3-1 微板法 48T)

免责声明：测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验,否则由此导致的后果用户自行承担!

一、试剂盒组成与配制（试剂盒有效期 1 年）：

	试剂组成	试剂规格	保存条件
试剂一	澄清剂	3mL×1 瓶	室温
试剂一天冷时会凝固，每次测试前适当 37℃水浴加温以加速溶解，直至透明方可应用。			
试剂二	缓冲液	45mL×1 瓶	4℃冷藏
试剂三	显色剂	15mL×1 瓶	4℃避光冷藏
工作液配制：试剂一：试剂二：试剂三=0.1：3：1 的比例进行配制，现用现配，用多少配多少			
试剂四	10nmol/mL 标准品	1mL×1 瓶	4℃密封冷藏
试剂五	10 倍浓缩提取液	20mL×1 瓶	4℃密封冷藏
试剂五应用提取液的配制：10 倍浓缩提取液：双蒸水=1：9 的比例配制成应用提取液			

二、所需仪器耗材和试剂：

含 530nm 波长的酶标仪及 96 孔板（附送一块）、95℃水浴锅、台式离心机、各种规格移液器、无水乙醇、双蒸水、涡旋混匀器、离心管。

三、操作步骤：

- 1、**样本前处理：**准确称取植物组织重量，按重量体积比 1：9 加入 9 倍体积的试剂五应用提取液（如 0.1g 植物组织+0.9mL 的试剂五应用提取液），剪碎后用内切式匀浆机冰水浴匀浆，8000~10000 转/分，每次 10~15 秒，间歇 30 秒，共 3~5 次，再将匀浆吸入到离心管中，3500~4000 转/分，离心 10 分钟，取上清待测。
- 2、**操作表：**（可在 1.5 或 2.0mL 的离心管里反应）

	空白管	标准管	测定管
无水乙醇（μL）	50		
10nmol/mL 标准品(μL)		50	
待测样本（μL）			50
工作液（μL）	1000	1000	1000

离心管盖上盖(盖上用针扎一小孔)，旋涡混匀器混匀，95℃以上水浴 20 分钟，取出后流水冷却，波长 530nm，将酶标板空板进行读数，准确吸取 0.25mL 各管反应液加入到该 96 孔板中，酶标仪测定各孔吸光度（计算时要减去空板读数）。

四、计算公式：

$$\text{MDA 含量} \left(\frac{\text{nmol}}{\text{g}} \right) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \frac{W}{V_{\text{提}}}$$

C_{标准} 为标准品浓度，10nmol/mL ；
W 为植物组织重（g）；
V_提 为所加提取液的总量（mL）。

五、注意点：

- 1、部分样本中 MDA 含量较低，可将操作表中的空白管、标准管、测定管的取样量均加大到 100μL 进行测定。
- 2、用离心管操作时,管盖上用针扎一小孔,水浴时水浴锅液面不高于管盖。
- 3、水浴时间及温度要固定，反应时间到后立即用流水冷却。冷却后呈色稳定，12 小时内吸光度基本不变。
- 4、沸水浴 20 分钟，流水冷却后，转入 96 孔板中的液体量一定要准确，并且不能有气泡。
如有气泡可以放一段时间等气泡消失后再测。（最好先将酶标板空板进行扫描）
- 5、如没有酶标仪，可以用微量比色皿在分光光度计上进行测定。

六、测试原理

过氧化脂质降解产物中的丙二醛（MDA）可与硫代巴比

妥酸(TBA)缩合，形成红色产物,在 532nm 处有最大吸收峰。因底物为硫代巴比妥酸（Thiobarbituric Acid TBA）所以此法称 TBA 法。

七、测定意义：

机体通过酶系统与非酶系统产生氧自由基，后者能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸（polyunsaturated fatty acid, PUFA），引发脂质过氧化作用，并因此形成脂质过氧化物。如：醛基（丙二醛 MDA）、酮基、羟基、羰基、氢过氧基或内过氧基，以及新的氧自由基等。脂质过氧化作用不仅把活性氧转化成活性化学剂，即非自由基性的脂类分解产物，而且通过链式或链式支链反应，放大活性氧的作用。因此，初始的一个活性氧能导致很多脂类分解产物的形成，这些分解产物中，一些是无害的，另一些则能引起细胞代谢及功能障碍，甚至死亡。氧自由基不但通过生物膜中多不饱和脂肪酸（PUFA）的过氧化引起细胞损伤，而且还能通过脂氢过氧化物的分解产物引起细胞损伤。因而测试 MDA 的量常常可反映机体内脂质过氧化的程度，间接地反映出细胞损伤的程度。

MDA 的测定常常与 SOD 的测定相互配合，SOD 活力的高低间接反应了机体清除氧自由基的能力，而 MDA 的高低又间接反应了机体细胞受自由基攻击的严重程度，通过 SOD 与 MDA 的结果分析有助于医学、生物学、药理及工农业生产的发展。