

## 植物丙二醛（MDA）测试盒

微板法:48T

### 一、试剂盒组成与配制:

48T	试剂组成	48T	保存条件
试剂一	澄清剂	3ml×1 瓶	室温保存 1 年
试剂一天冷时会凝固，每次测试前适当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 1 年
试剂三	显色剂	15ml×1 瓶	4℃避光冷藏 1 年
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 1 年
试剂五	贮备液（10 倍浓缩）	20ml×1 瓶	4℃密封冷藏 1 年
试剂五应用提取液的配制：试剂五贮备液：双蒸水=1：9 的比例配制成应用提取液附赠 96 孔板×1 块；盖子上带孔的离心管 60 只			

### 二、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、 编号：对赠送给你的盖子上带孔的离心管进行编号，并用它加样加试剂进行操作

3、 操作表：

	空白管	标准管	测定管
无水乙醇 ( $\mu$ l )	50		
10nmol/ml 标准品( $\mu$ l )		50	
待测样本 ( $\mu$ l )			50
工作液 ( $\mu$ l )	2000	2000	2000

盖上盖，旋涡混匀器混匀，95℃以上水浴 20 分钟，取出后流水冷却，530nm，将酶标板空板进行扫描，准确吸取 0.25ml 各管反应液加入到新的 96 孔板中，酶标仪测定各孔吸光度（计算时要减去空板读数）。

三、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 100  $\mu$  l 进行测定。
- 2、附送盖子上带孔的 EP 管 60 个，直接编号后用于操作。
- 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。如有气泡可以放一些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。