

丙二醛(MDA)检测试剂盒(TBA 微板法)

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丙二醛(MDA)检测试剂盒(TBA微板法,MDA Assay Kit)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血浆、血清、尿液、动植物组织或细胞裂解液中MDA进行定量检测,广泛用于脂质氧化(lipid peroxidation)水平检测,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535nm处有最大吸收,据此可以通过比色法进行检测。另外MDA-TBA加合物也可以在535nm被激发产生最大发射波长553nm,据此也可以进行荧光检测。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	TO1011 100T	Storage
试剂(A): TBA		100mg	RT 避光
试剂(B): TBA 稀释液		10ml	RT
试剂(C): 抗氧化剂		0.5ml	-20°C 避光
试剂(D): MDA 标准品(1mmol/L)		0.2ml	-20°C 避光
试剂(E): MDA 检测液		9ml	RT
试剂(F): MDA 分离液		25ml	RT
使用说明书			1份

自备材料:

- 1、离心机、离心管、96孔板、酶标仪或分光光度计、水浴锅或恒温箱
- 2、生理盐水或PBS

操作步骤(仅供参考):

- 1、准备样品:

①血清、血浆、尿液、脑脊液样品：从待测样本中分离出的血清或血浆不应有溶血，直接检测，如超过线性范围，用生理盐水或 PBS 稀释后检测。

②组织、细胞等样品：组织或细胞可以使用 PBS 或 RAPI 裂解液等进行匀浆或裂解，匀浆或裂解组织时组织重量占匀浆液或裂解液的比例应为 10%；对于细胞，每 10^6 个细胞使用 0.1ml 裂解液或匀浆液，匀浆或裂解后 4°C 8000~12000g 离心 10min，取上清用于后续测定。匀浆或裂解等样品制备步骤宜在冰浴或 4°C 条件下进行操作，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组织或细胞内 MDA 含量。

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
其他	Trypsin ($\leq 10\mu\text{g/ml}$)	否
	Glycerol ($\leq 10\%$)	否
	Sucrose (250mM)	是

2、配制 TBA 工作液：称取适量 TBA，用 TBA 稀释液配制成浓度为 0.68% 的 TBA 工作液；例如取 34mg TBA 用 5ml TBA 稀释液配制，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、稀释系列标准品：取适量 MDA 标准品(1mmol/L)，用恰当溶液稀释至 1、2、5、10、 $20\mu\text{M}$ (如果进行简易快速检测，标准品直接稀释 $10\mu\text{M}$)。注意：待测样品为血清、血浆时，标准品宜用生理盐水稀释；待测样品由匀浆液、裂解液、PBS 获得时，标准品宜

用相同溶液稀释，其原则是保证空白管、标准管、测定管具有可比性；配制好的 MDA 标准品 4°C 避光保存，至少 3 个月内有效。

- 4、配制 MDA 检测工作液：临检测前，根据待测定的样品数(含对照)，参考下表新鲜配制适量的 MDA 检测工作液。

检测次数	1 次	10 次	20 次
TBA 工作液	75 μ l	750 μ l	1500 μ l
抗氧化剂	3.1 μ l	31 μ l	62 μ l
MDA 检测液	7.5 μ l	75 μ l	150 μ l
MDA 分离液	225 μ l	2250 μ l	4500 μ l
总体积	310.6 μ l	3106 μ l	6212 μ l

- 5、MDA 加样：在离心管或其它适当容器内加入 8 μ l 适当溶液作为空白对照(注意：待测样品为血清、血浆时，标准品宜用生理盐水稀释；待测样品由匀浆液、裂解液、PBS 获得时，标准品宜用相同溶液稀释，其原则是保证空白管、标准管、测定管具有可比性)，加入 8 μ l 上述不同浓度标准品用于制作标准曲线(如果进行简易快速检测，直接加入浓度为 10 μ M 的标准品)，加入 8 μ l 样品用于测定；随后加入 300 μ l MDA 检测工作液。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
匀浆液、裂解液、PBS、生理盐水等	8	—	—
标准品	—	8	—
待测样品	—	—	8
MDA 检测工作液	300	300	300

混匀，加盖，95°C 水浴煮沸 40min，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金属浴。

- 6、MDA 测定：水浴或流水冷却至室温，3000r/min 离心 15min 或 4000r/min 离心 10min，取上清，其颜色为黄色至棕红色，蒸馏水调零，酶标仪测定 535nm 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 $A_{\text{空白}}$ 、 $A_{\text{标准}}$ 、 $A_{\text{测定}}$ 。

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 $\mu\text{mol/g}$ 蛋白或组织。

简易快速血清、血浆、尿液等液体样品中 MDA 含量计算公式：

$$\text{MDA 浓度}(\mu\text{mol/L}) = (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times 10$$

简易快速细胞、组织样品中 MDA 含量计算公式：

$$\text{MDA 浓度}(\mu\text{mol/g}) = (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times 10 / \text{蛋白质浓度}(\text{mg/ml})$$

式中： $A_{\text{测定}}$ = 测定孔的吸光度

$A_{\text{标准}}$ = 标准孔的吸光度

$A_{\text{空白}}$ = 空白孔的吸光度

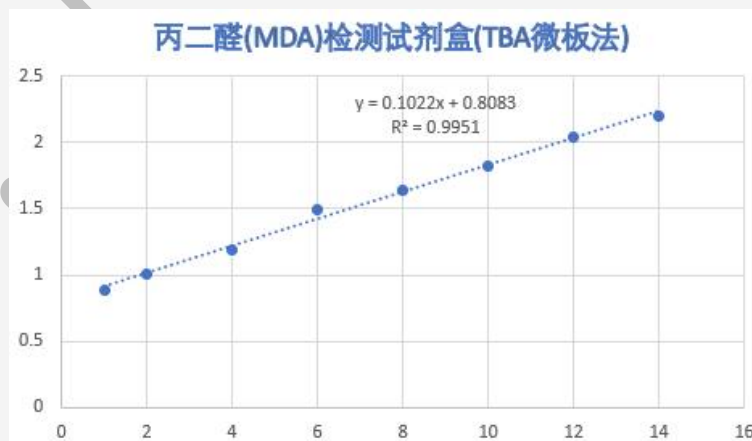
参考区间： 健康成年人血清 MDA: $9.58 \pm 2.15 \mu\text{mol/L}$ 血浆 MDA: $7.31 \pm 1.27 \mu\text{mol/L}$

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、参考取样量：血清、血浆、尿液取 $100 \mu\text{l}$ ；低密度脂蛋白悬液取 $100 \sim 200 \mu\text{l}$ ；食用油取 $30 \mu\text{l}$ ；肝脏、心肌、肌肉等，取 5%或 10%匀浆 $100 \sim 200 \mu\text{l}$ 。
- 3、测定样品吸光度值较低时，可将水浴延长至 80min，但应同时延长，以免造成批间差异。
- 4、待测样本如不能及时测定，应置于 -20°C 保存，4 天内稳定。
- 5、避免使用 EDTA、枸橼酸、氟化钠、草酸等抗凝剂。
- 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 $10 \mu\text{M}$ 时，通过酶标仪测定其吸光度多在 1.3~2.3 之间(未调零)；Leagene 测定 MDA 标准在 1、2、4、6、8、10、12、14 μM 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 $2 \mu\text{mol/L}$ 以下，标准品浓度在 $16 \mu\text{mol/L}$ 以上，标准曲线会有偏差。