

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丙二醛(MDA)检测试剂盒(TBA比色法,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 | TO1013 | TO1013 | Storage |
|-------------------------|----|--------|---------|----------|
| | | 50T | 100T | |
| 试剂(A): TBA | | 0.4g | 0.8g | RT 避光 |
| 试剂(B): TBA 稀释液 | | 50ml | 100ml | RT |
| 试剂(C): 抗氧化剂 | | 2.5ml | 5ml | -20°C 避光 |
| 试剂(D): MDA 标准品(1mmol/L) | | 0.2ml | 0.4ml | -20°C 避光 |
| 试剂(E): MDA 检测液 | | 5ml | 10ml | RT |
| 试剂(F): MDA 分离液 | | 2×75ml | 2×150ml | RT |
| 使用说明书 | | 1份 | | |

自备材料:

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

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 |
| | 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 TBA 稀释液配制成浓度为 0.68% 的 TBA 工作液；例如取 68mg TBA 用 10ml 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 | 0.75ml | 7.5ml | 15ml |
| 抗氧化剂 | 0.031ml | 0.31ml | 0.62ml |
| MDA 检测液 | 0.075ml | 0.75ml | 1.5ml |
| MDA 分离液 | 2.25ml | 22.5ml | 45ml |
| 总体积 | 3.106ml | 31.06ml | 62.12ml |

- 5、MDA 加样: 在离心管或其它适当容器内加入 0.08ml 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 0.08ml 上述不同浓度系列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 0.08ml 样品用于测定; 随后加入 3ml 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(ml) | 空白管 | 标准管 | 测定管 |
|-------------------|------|------|------|
| 匀浆液、裂解液、PBS、生理盐水等 | 0.08 | — | — |
| 标准品 | — | 0.08 | — |
| 待测样品 | — | — | 0.08 |
| MDA 检测工作液 | 3 | 3 | 3 |

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, 比色杯光径应为 1cm, 分光光度计测定 535nm 处空白管、标准管、测定管的吸光度, 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 μ 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

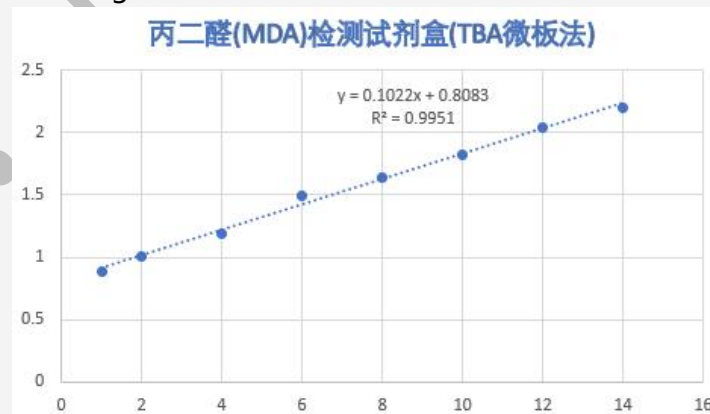
参考区间： 健康成年人血清 MDA: $9.58 \pm 2.15 \mu\text{mol/L}$ 血浆 MDA: $7.31 \pm 1.27 \mu\text{mol/L}$

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 0.1ml；低密度脂蛋白悬液取 0.1~0.2ml；食用油取 0.03ml；肝脏、心肌、肌肉等，取 5%或 10%匀浆 0.1~0.2ml。
- 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、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 7、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。