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。

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:

编号 / 名称	GCTO1011 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℃ 避光
试剂(D): MDA 标准品(1mmol/L)	0.2ml	-20℃ 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℃ 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℃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 (≤1%)	否
	Triton X-100 (≤1%)	否
	Tween 20 (≤1%)	否
抑制剂/螯合剂	PMSF (≤200μM)	否
	EDTA (≤1mM)	否
	EGTA (≤1mM)	否
	Antipain (≤100μg/ml)	否
	Chymostatin (≤10μg/ml)	否
	Leupeptin (≤10μg/ml)	否
	Trypsin (≤10μg/ml)	否
其他	Glycerol (≤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℃促溶，并可通过反复剧烈 Vortex 促溶；配制好的 TBA 工作液 4℃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、20μM(如果进行简易快速检测，标准品直接稀释 10μM)。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℃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	75μl	750μl	1500μl
抗氧化剂	3.1μl	31μl	62μl
MDA 检测液	7.5μl	75μl	150μl
MDA 分离液	225μl	2250μl	4500μl
总体积	310.6μl	3106μl	6212μl

5、 MDA 加样: 在离心管或其它适当容器内加入 8μl 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 8μl 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 10μM 的标准品)，加入 8μl 样品用于测定；随后加入 300μl 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(μl)	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℃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 $A_{空白}$、$A_{标准}$、$A_{测定}$。

计算:

如果进行简易快速检测，直接以 10μM 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μmol/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：

MDA 浓度(μmol/L)=($A_{测定}$-$A_{空白}$)/($A_{标准}$-$A_{空白}$)×10

简易快速细胞、组织样品中 MDA 含量计算公式：

MDA 浓度(μmol/g)=($A_{测定}$-$A_{空白}$)/($A_{标准}$-$A_{空白}$)×10/蛋白质浓度(mg/ml)

式中：$A_{测定}$=测定孔的吸光度

$A_{标准}$=标准孔的吸光度

$A_{空白}$=空白孔的吸光度

参考区间：健康成年人血清 MDA：9.58±2.15μmol/L　血浆 MDA：7.31±1.27μmol/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 100μl；低密度脂蛋白悬液取 100～200μl；食用油取 30μl；肝脏、心肌、肌肉等，取 5%或 10%匀浆 100~200μl。

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。

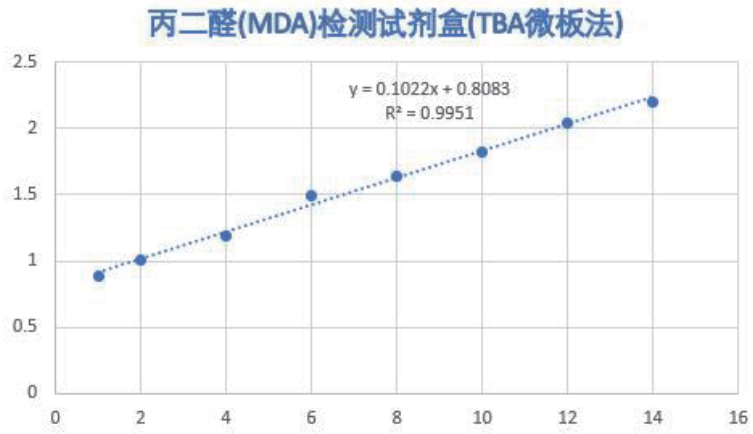
4、待测样本如不能及时测定，应置于-20℃保存，4 天内稳定。

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：测定 MDA 标准在 10μM 时，通过酶标仪测定其吸光度多在 1.3~2.3 之间(未调零)；测定 MDA 标准在 1、2、4、6、8、10、12、14μM 时吸光度，据此 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 测定经验显示，标准品浓度在 2μmol/L 以下，标准品浓度在 16μmol/L 以上，标准曲线会有偏差。