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。

丙二醛(MDA)检测试剂盒(TBA 比色法，MDAAssay 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	GCTO1013 50T	GCTO1013 100T	Storage
试剂(A): TBA	0.4g	0.8g	RT 避光
试剂(B): TBA 稀释液	50ml	100ml	RT 避光
试剂(C): 抗氧化剂	2.5ml	5ml	4℃
试剂(D): MDA 标准品(1mmol/L)	0.2ml	0.4ml	-20℃ 避光
试剂(E): MDA 检测液	5ml	10ml	RT
试剂(F): MDA 分离液	2×75ml	2×150ml	RT 避光
使用说明书	说明书		

自备材料:

1、 生理盐水或 PBS

2、 离心机、离心管或 96 孔板

3、 光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℃ 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 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℃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	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 10μM 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℃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 $A_{空白}$、$A_{标准}$、$A_{测定}$。

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 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。

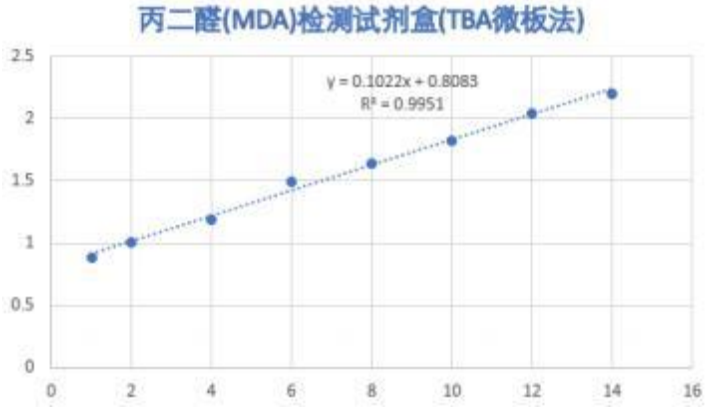
3、测定样品吸光度值较低时，可将水浴延长至 80min，但应同时延长，以免造成批间差异。

4、待测样本如不能及时测定，应置于-20℃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。

有效期： 12 个月有效； 4℃运输，-20℃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、14 μM 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。