丙二醛(MDA)检测试剂盒(TBA 荧光法)

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 荧光法，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，随后通过荧光比色法用于对血浆、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 553nm 处有最大吸收，以 515nm 为激发光，据此可以通过荧光比色法进行检测。本试剂盒仅用于科研领域，不宜用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

编号 / 名称	GCTO1015 100T	Storage
试剂(A): MDA 沉淀液	50ml	RT
试剂(B): 磷钨酸溶液	50ml	RT 避光
试剂(C): MDA 标准品(1mmol/L)	0.4ml	-20℃ 避光
试剂(D): TBA	0.8g	RT 避光
试剂(E): TBA 稀释液	100ml	RT
试剂(F): 抗氧化剂	5ml	-20℃ 避光
试剂(G): MDA 分离液	4×100ml	RT 避光
使用说明书	说明书	

自备材料:

1、蒸馏水

2、离心管、小试管或 96 孔板、荧光分光光度计或荧光酶标仪、离心机、水浴锅或恒温箱

操作步骤(仅供参考):

1、样本处理:

①血清、血浆、尿液、脑脊液样本：从待测样本中分理出的血清或血浆不应有溶血。取20μl 待测液体样本，依次加入 0.5ml MDA 沉淀液、3.5ml 蒸馏水和 0.5ml 磷钨酸溶液，摇匀，室温静置 5min，3500r/min 离心 10min，弃上清。沉淀加入 1ml 蒸馏水，振荡混匀 2min，以便充分溶解沉淀(MDA 样品)，即获得 MDA 待测液。

②组织、细胞等样本：组织或细胞可以使用 PBS 或 Leagene Western 及 IP 细胞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，1600r/min 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℃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的 MDA 含量。取 20μl 待测匀浆后提取的上清，依次加入 0.5ml MDA 沉淀液、3.5ml 蒸馏水和 0.5ml 磷钨酸溶液，摇匀，室温静置 5min，3500r/min 离心 10min，弃上清。沉淀加入 1ml 蒸馏水，振荡混匀 2min，以便充分溶解沉淀(MDA 样品)，即获得 MDA 待测液。

③本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、 稀释标准品：取适量 MDA 标准品(1mmol/L)用蒸馏水稀释至 0.5、1、2、5、10μM(如果进行简易快速检测，标准品直接稀释至 0.5μM)。

3、 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。

4、 MDA 加样：在离心管或其它适当容器内参考下表设置检测反应体系，依次加入试剂：

加入物	空白管	标准管	测定管
蒸馏水	1ml	-	-
MDA 标准品	-	1ml	-
MDA 待测液	-	-	1ml
TBA 工作液	1ml	1ml	1ml
抗氧化剂	30μl	30μl	30μl

混匀，加盖，95℃准确水浴煮沸 60min(勿动)，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的金属浴仪器。

5、 MDA 测定：水浴或流水冷却至室温，加入 MDA 分离液 3.5ml，振摇并抽提 1min，3000r/min 离心 5min，取上清，蒸馏水调零，用荧光光度计或荧光酶标仪检测荧光强度，激发光 515nm，发射光 553nm。

计算：

对于血浆、血清或尿液等样品，以 MDA 标准品浓度为横坐标，以对应的荧光强度为纵坐标，制作标准曲线，根据标准曲线计算处 MDA 提取液的浓度；

如果进行简易快速检测，直接乘以 0.5μM 标准品进行计算获得 MDA 的摩尔浓度，对于细胞、或组织样品，计算出样品溶液中的 MDA 含量后，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/mg 蛋白或μmol/mg 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)=($A_{测定}$-$A_{空白}$)/($A_{标准}$-$A_{空白}$)×25

简易快速细胞、组织样品中 MDA 含量计算公式：

MDA 浓度(μmol/mg)=($A_{测定}$-$A_{空白}$)/($A_{标准}$-$A_{空白}$)×25/蛋白质浓度(mg/ml)

式中：$A_{测定}$=测定孔的荧光强度

$A_{标准}$=标准孔的荧光强度

$A_{空白}$=空白孔的荧光强度

参考区间：

健康成年人血清 MDA：1.63±0.38μmol/L

60 岁以上的健康成年人血清 MDA：2.14±0.56μmol/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 20μl；低密度脂蛋白悬液取 20～40μl；食用油取 30μl；肝脏、心肌、肌肉等，取 5%或 10%匀浆 20～40μl。
3、 待测样本如不能及时测定，应置于-20℃保存，4 天内稳定。
4、 避免使用 EDTA、枸橼酸、氟化钠、草酸等抗凝剂。
5、 稀释后的 MDA 标准品 4℃避光保存，3 个月内有效。
6、 TBA 工作液应 4℃避光保存，1 个月有效。
7、 MDA 测定步骤中，离心分层抽取上层时，若出现浑浊，可加 1 滴无水乙醇
8、 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
9、 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。

相关产品：

产品编号	产品名称
GCDC0032	Masson 三色染色液
GCDM0007	瑞氏-姬姆萨复合染色液
GCDP0013	GUS 染色液(即用型)
GCPW0053	Western 抗体洗脱液(碱性)
GCTC1167	尿素(Urea)检测试剂盒(脲酶波氏比色法)

