

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

名称 \ 编号	ADS006TO1	Storage
	100T	
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°C 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°C 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：从待测样本中分离出的血清或血浆不应有溶血。取 20 μ l 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 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 10⁶ 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 $^{\circ}$ C 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 20 μ l 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 (\leq 1%)	否
	Triton X-100 (\leq 1%)	否
	Tween 20 (\leq 1%)	否
抑制剂/螯合剂	PMSF (\leq 200 μ M)	否
	EDTA (\leq 1mM)	否
	EGTA (\leq 1mM)	否
	Antipain (\leq 100 μ g/ml)	否
	Chymostatin (\leq 10 μ g/ml)	否
	Leupeptin (\leq 10 μ g/ml)	否
其他	Trypsin (\leq 10 μ g/ml)	否
	Glycerol (\leq 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、10 μ M(如果进行简易快速检测，标准品直接稀释至 0.5 μ M)。

- 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：

$$\text{MDA 浓度}(\mu\text{mol/L}) = (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times 25$$

简易快速细胞、组织样品中 MDA 含量计算公式：

$$\text{MDA 浓度}(\mu\text{mol/mg}) = (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times 25 / \text{蛋白质浓度}(\text{mg/ml})$$

式中： $A_{\text{测定}}$ = 测定孔的荧光强度

$A_{\text{标准}}$ = 标准孔的荧光强度

$A_{\text{空白}}$ = 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: $2.14 \pm 0.56 \mu\text{mol/L}$

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 $20 \mu\text{l}$ ；低密度脂蛋白悬液取 $20 \sim 40 \mu\text{l}$ ；食用油取 $30 \mu\text{l}$ ；肝脏、心肌、肌肉等，取 5%或 10%匀浆 $20 \sim 40 \mu\text{l}$ 。
- 3、待测样本如不能及时测定，应置于 -20°C 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°C 避光保存，3 个月内有效。
- 6、TBA 工作液应 4°C 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。低温运输，按要求保存。