

丙二醛(MDA)检测试剂盒(TBA 荧光法)说明书

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

产品简介：

动物或植物细胞发生氧化应激 (oxidativestress) 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 thromboxanesynthase 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，MDAAssayKit)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(thiobarbituricacid,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(lipidperoxidation)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	规格		保存条件
丙二醛(MDA)检测试剂盒	50T	100T	4℃
试剂(A):MDA 沉淀液	25ml	50ml	RT
试剂(B):磷钨酸溶液	25ml	50ml	RT 避光
试剂(C):MDA 标准品(1mmol/L)	0.2ml	0.4ml	-20℃ 避光
试剂(D):TBA	0.4g	0.8g	RT 避光
试剂(E):TBA 稀释液	50ml	100ml	RT 避光
试剂(F):抗氧化剂	2.5ml	5ml	4℃
试剂(G):MDA 分离液	2×100ml	4×100ml	RT 避光
使用说明书	1 份		
有效期	1 年		

自备材料：

- 1、蒸馏水
- 2、离心管、小试管或 96 孔板

- 3、荧光分光光度计或荧光酶标仪
- 4、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 0.5mlMDA 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℃ 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 0.5mlMDA 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
	TritonX-100($\leq 1\%$)	否
	Tween20($\leq 1\%$)	否
抑制剂/螯合剂	PMSF($\leq 200 \mu$ M)	否
	EDTA(≤ 1 mM)	否
	EGTA(≤ 1 mM)	否
	Antipain($\leq 100 \mu$ g/ml)	否
	Chymostatin($\leq 10 \mu$ g/ml)	否
	Leupeptin($\leq 10 \mu$ g/ml)	否
	Trypsin($\leq 10 \mu$ g/ml)	否
其他	Glycerol($\leq 10\%$)	否
	Sucrose(250mM)	否

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 34mgTBA 用 5mlTBA 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	30 μ l	30 μ l	30 μ l

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(Heatblock)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 0.5 μ M 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 μ mol/mg 蛋白或 μ mol/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(μ mol/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(μ mol/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: $1.63 \pm 0.38 \mu$ mol/L

60 岁以上的健康成年人血清 MDA: $2.14 \pm 0.56 \mu$ 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 μ l；低密度脂蛋白悬液取 20~40 μ l；食用油取 30 μ l；肝脏、心肌、肌肉等，取 5%或 10%匀浆 20~40 μ l。
- 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