

产品货号：PM23017

产品名称：丙二醛(MDA)检测试剂盒(TBA比色法)

保存条件：12个月有效；低温运输，按要求保存。

产品描述：

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, 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。

自备材料：

- 1、生理盐水或PBS
- 2、离心机、离心管或96孔板、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10⁶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 ($\leq 200\mu\text{M}$)	否
	EDTA ($\leq 1\text{mM}$)	否
	EGTA ($\leq 1\text{mM}$)	否
	Antipain ($\leq 100\mu\text{g/ml}$)	否
	Chymostatin ($\leq 10\mu\text{g/ml}$)	否
	Leupeptin ($\leq 10\mu\text{g/ml}$)	否
	Trypsin ($\leq 10\mu\text{g/ml}$)	否
其他	Glycerol ($\leq 10\%$)	否
	Sucrose (250mM)	是

2、配制TBA工作液：称取适量TBA，用TBA稀释液配制浓度为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、20 μM (如果进行简易快速检测，标准品直接稀释10 μM)。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10 μM 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 $A_{\text{空白}}$ 、 $A_{\text{标准}}$ 、 $A_{\text{测定}}$ 。

计算：

如果进行简易快速检测，直接以10 μM 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，根据标准曲线计算出MDA提取液的浓度(C_1 ，

μmol/L); 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(C_2 , μmol/g), 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:

$$\text{MDA浓度}(\mu\text{mol/L})=C_1=(A_{\text{测定}}-A_{\text{空白}})/(A_{\text{标准}}-A_{\text{空白}})\times 10$$

简易快速细胞、组织样品中MDA含量计算公式:

$$\begin{aligned}\text{MDA含量}(\mu\text{mol/g})=C_2 &=(A_{\text{测定}}-A_{\text{空白}})/(A_{\text{标准}}-A_{\text{空白}})\times 10/\text{蛋白质浓度}(\text{mg/ml}) \\ &=C_1/\text{蛋白质浓度}(\text{mg/ml})\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{MDA含量}(\mu\text{mol/g})=C_2 &=(A_{\text{测定}}-A_{\text{空白}})/(A_{\text{标准}}-A_{\text{空白}})\times 10/[w/(v_{\text{总}}\times 10^{-3})] \\ &=C_1/[w/(v_{\text{总}}\times 10^{-3})]\end{aligned}$$

式中: $A_{\text{测定}}$ = 测定孔的吸光度 w = 组织样品质量(g)

$A_{\text{标准}}$ = 标准孔的吸光度 $v_{\text{总}}$ = 样本提取液总体积(ml)

$A_{\text{空白}}$ = 空白孔的吸光度

参考区间: 健康成年人血清MDA: $9.58\pm 2.15\mu\text{mol/L}$ 血浆MDA: $7.31\pm 1.27\mu\text{mol/L}$

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°C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、为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 7、试剂开封后请尽快使用, 以防影响后续实验效果。