



丙二醛(MDA)检测试剂盒(TBA荧光法)

货号: R21872

储存条件: -20℃,避光

有效期: 12个月

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。

Yuanye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	R21872 50T	R21872 100T	Storage
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



试剂(F): 抗氧化剂	2.5ml	5ml	-20°C 避光
试剂(G): MDA分离液	2×100ml	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Yuanye 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°C进行操作。样品准备完毕后可以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
	CHAPS (≤1%)	否



去垢剂	Triton X-100 ($\leq 1\%$)	否
	Tween 20 ($\leq 1\%$)	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、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 μM (如果进行简易快速检测, 标准品直接稀释至0.5 μM)。
- 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 μl	30 μl	30 μl

混匀, 加盖, 95 $^{\circ}\text{C}$ 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: $1.63 \pm 0.38 \mu\text{mol/L}$

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。