

## 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。

Leagene 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	TO1015	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 $\mu$ 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 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<sup>6</sup> 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 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 $\mu$ 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 $\mu$ M)	否
	EDTA ( $\leq$ 1mM)	否
	EGTA ( $\leq$ 1mM)	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)	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 $\mu$ M(如果进行简易快速检测，标准品直接稀释至 0.5 $\mu$ 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 20~40 $\mu\text{l}$ ; 食用油取 30 $\mu\text{l}$ ; 肝脏、心肌、肌肉等, 取 5%或 10%匀浆 20~40 $\mu\text{l}$ 。
- 3、待测样本如不能及时测定, 应置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存, 3 个月内有效。
- 6、TBA 工作液应 4 $^{\circ}\text{C}$ 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 个月有效。低温运输, 按要求保存。

**相关产品:**

产品编号	产品名称
DC0032	Masson 三色染色液
DM0007	瑞氏-姬姆萨复合染色液
DP0013	GUS 染色液(即用型)
PW0053	Western 抗体洗脱液(碱性)
TC1167	尿素(Urea)检测试剂盒(脲酶波氏比色法)