

## 丙二醛(MDA)检测试剂盒(TBA 比色法)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 比色法，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 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。

### 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):TBA	0.4g	0.8g	RT 避光
试剂(B):TBA 稀释液	50ml	100ml	RT 避光
试剂(C):抗氧化剂	2.5ml	5ml	4℃
试剂(D):MDA 标准品(1mmol/L)	0.2ml	0.4ml	-20℃避光
试剂(E):MDA 检测液	5ml	10ml	RT
试剂(F):MDA 分离液	2×75ml	2×150ml	RT 避光
使用说明书	1 份		
有效期	1 年		

### 自备材料：

- 1、生理盐水或 PBS
- 2、离心机、离心管或 96 孔板
- 3、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 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℃ 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
	TritonX-100(≤1%)	否
	Tween20(≤1%)	否
抑制剂/螯合剂	PMSF(≤200 μ M)	否
	EDTA(≤1mM)	否
	EGTA(≤1mM)	否
	Antipain(≤100 μ g/ml)	否
	Chymostatin(≤10 μ g/ml)	否
	Leupeptin(≤10 μ g/ml)	否
	Trypsin(≤10 μ g/ml)	否
其他	Glycerol(≤10%)	否
	Sucrose(250mM)	否

**2、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 68mgTBA 用 10mlTBA 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 μ M(如果进行简易快速检测, 标准品直接稀释 10 μ M)。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 μ M 的标准品)，加入 0.08ml 样品用于测定；随后加入 3mlMDA 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(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 空白、A 标准、A 测定。

**计算：**如果进行简易快速检测，直接以 10 μ M 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，根据标准曲线计算处 MDA 提取液的浓度；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，例如 μ mol/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：**

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

**简易快速细胞、组织样品中 MDA 含量计算公式：**

MDA 浓度( $\mu\text{mol/g}$ )=(A 测定-A 空白)/(A 标准-A 空白) $\times$ 10/蛋白质浓度(mg/ml)

式中：A 测定=测定孔的吸光度

A 标准=标准孔的吸光度

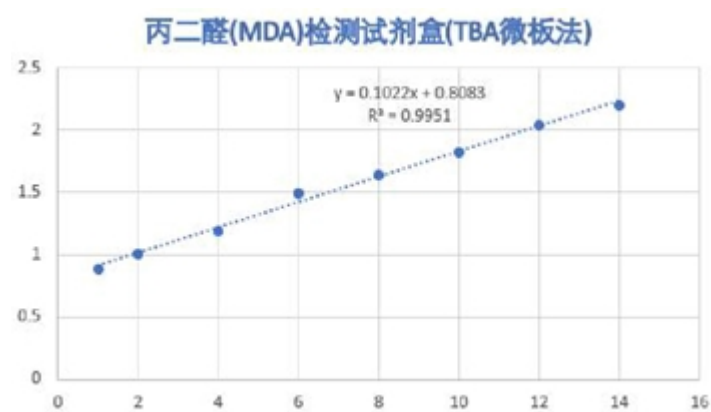
A 空白=空白孔的吸光度

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 $-20^{\circ}\text{C}$ 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。

附录：参考标准曲线范围：测定 MDA 标准在  $10 \mu\text{M}$  时，通过酶标仪测定其吸光度多在 1.3~2.3 之间(未调零)；测定 MDA 标准在 1、2、4、6、8、10、12、14  $\mu\text{M}$  时吸光度，据此作出其标准曲线如下：



**注意：**由于检测仪器和操作手法等条件的不同，参考值范围会有波动，该值仅供参考，对于要求精确计算 MDA 含量的，可以进行多点测定；根据测定经验显示，标准品浓度在  $2 \mu\text{mol/L}$  以下，标准品浓度在  $16 \mu\text{mol/L}$  以上，标准曲线会有偏差。