

丙二醛 (MDA) 检测试剂盒

MDA Assay Kit

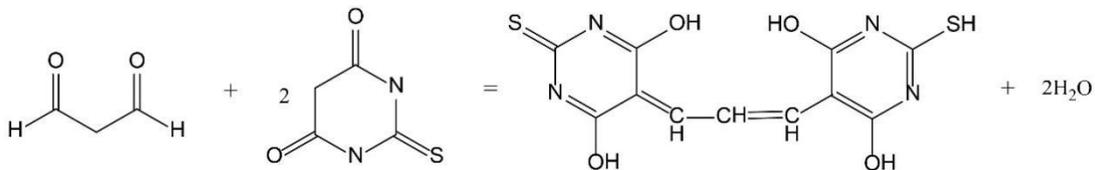
产品编号	产品名称	规格
TE-MB-003	MDA Assay Kit	100T

产品简介

丙二醛 (MDA) 检测试剂盒是一种灵敏简单的检测脂质过氧化产物丙二醛的试剂盒。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, 通过检测 MDA 的水平可评价脂质氧化的水平, 因此 MDA 的测定被广泛用作脂质氧化的指标。

本试剂盒是一种基于 MDA 和硫代巴比妥酸 (Thiobarbituric acid, TBA) 在较高温度和酸性环境中反应生成红色 MDA-TBA 加和物, MDA-TBA 加和物在 535nm 波长具有最大吸收, 据此可以通过比色法进行检测。另外 MDA-TBA 受 535nm 波长激发光激发, 在 553nm 波长发出荧光, 因此, 可以通过荧光法检测 MDA 浓度。荧光法相对比色法灵敏度提高一个数量级。

反应示意图如下:



本试剂盒具有良好的检测线性, 通过比色法检测 MDA 的线性范围为 1.56-50 μM , 灵敏度 $\leq 1.56 \mu\text{M}$; 荧光法检测 MDA 的线性范围为 0.156-5 μM , 灵敏度 $\leq 0.156 \mu\text{M}$

本试剂盒能够检测动物血浆、血清、细胞裂解上清和组织裂解上清中 MDA 含量。

试剂盒组成

组份编号	组份名称	规格	数量
TE-MB-003-1	TBA	50 mg/管	1
TE-MB-003-2	Acetic Acid Solution	7.5 ml/瓶	1
TE-MB-003-3	SDS Solution	12 ml/瓶	1
TE-MB-003-4	MDA Standard (1mM)	500 μl /管	1
TE-MB-003-5	BHT Solution (100 \times)	500 μl /管	1
—	说明书	份	1

需要而未提供的试剂及器材

1. 纯水

2. 细胞培养用 pH7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)和 RIPA 裂解液
3. 系列可调节量程移液器及吸头
4. 离心管、透明（比色法）或黑色（荧光法）96 孔板
5. 多功能酶标仪

储存条件

-20°C 储存，有效期 12 个月。TBA 配制成溶液后，可 4°C 避光储存一周。SDS Solution 使用前，请恢复至室温并彻底溶解后使用，首次使用后 4°C 储存即可。

注意事项

1. 血红蛋白对测定有一定干扰，请尽量避免血浆和血清制备过程中的溶血。
2. TBA 配制成溶液后不够稳定，要在 4°C 避光储存，一周内用完。
3. 初次使用试剂盒时，粉末试剂和小体积液体试剂请适当离心后使用。
4. 本产品仅限专业人员用于科学研究，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

测定前准备

1. 样品的准备

- 1.1 细胞裂解上清的准备：将需要测定的细胞 (2×10^6 - 2×10^7) 收集到 1.5 ml 的离心管中，4°C、300 g 离心 5 分钟，弃去上清；然后加入 1 ml PBS 清洗细胞，4°C、300 g 离心 5 分钟，弃去上清。加入 200 μ l 中等强度 RIPA 裂解液（提前加入 100 \times 的抗氧化剂 BHT Solution），冰浴裂解 30 分钟，4°C、10000 g 离心 10 分钟，收集上清。
- 1.2 组织裂解上清的准备：将需要测定的组织 (20-50 mg) 收集到玻璃匀浆器或自动匀浆管中，然后加入 500 μ l 中等强度 RIPA 裂解液（提前加入 100 \times 的抗氧化剂 BHT Solution），冰浴匀浆 1 分钟，4°C、10000 g 离心 10 分钟，收集上清。
- 1.3 血浆样品的准备：取新鲜抗凝血液，4°C、1000 g 离心 10 分钟，上清为血浆。
- 1.4 血清样品的准备：取新鲜血液，室温凝固 30 分钟，4°C、2000 g 离心 15 分钟，上清为血清。

注：各种样品，如果不立即进行测定，请冻存于 -80°C。

2. 试剂盒的准备

TBA Solution 的配制：将本试剂盒提供的 1 管 50 mg TBA 倒入 1 根 50 ml 离心管中，再加入 7.5 ml Acetic Acid Solution 震荡 2 分钟溶解 TBA，然后加入 17.5 ml 的纯水，彻底溶解 TBA，可以超声助溶，即为 TBA

Solution, 浓度为 2 mg/ml。

3. 标准品的准备

比色法标准品的配制：在 1.5 ml 离心管中，加入 950 μ l 纯水，再取 50 μ l 的 1 mM 浓度 MDA Standard 加入离心管中配制 50 μ M 浓度 MDA Standard；然后取另外 5 根 1.5 ml 离心管，分别加入 500 μ l 纯水，再吸取 500 μ l 的 50 μ M 浓度 MDA Standard 依次倍倍稀释为 25、12.5、6.25、3.12、1.56 μ M 浓度。

荧光法标准品的配制：在 1.5 ml 离心管中，加入 950 μ l 纯水，再取 50 μ l 的 1 mM 浓度 MDA Standard 加入离心管中配制 50 μ M 浓度 MDA Standard；然后取另一 1.5 ml 离心管，加入 900 μ l 纯水，再取 100 μ l 的 50 μ M 浓度 MDA Standard 加入离心管中配制 5 μ M 浓度 MDA Standard；另外取 5 根 1.5 ml 离心管，分别加入 500 μ l 纯水，再将 500 μ l 的 5 μ M 浓度 MDA 标准品依次倍倍稀释为 2.5、1.25、0.625、0.312、0.156 μ M 浓度。

测定方法

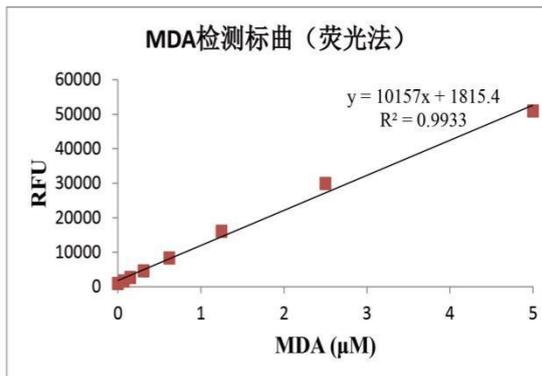
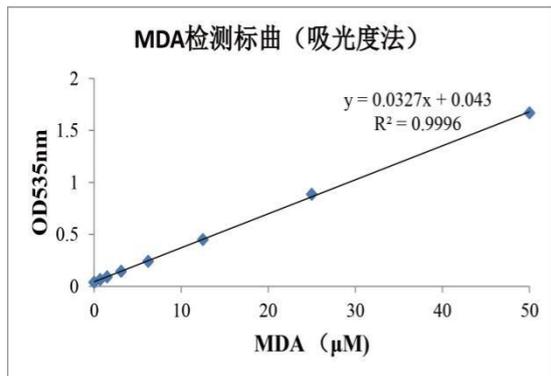
1. 取 1.5 ml 离心管，设置空白对照管、标准品管和样品管，如下表所示，在空白对照管中加入 100 μ l 纯水或 RIPA 裂解液，在标准品管中加入 100 μ l 梯度浓度 MDA Standard (1.56-50 μ M 或 0.156-5 μ M)，在样品管中加入 100 μ l 样品。

	空白对照管	标准品管	样品管
纯水或 RIPA 裂解液	100 μ l	—	—
MDA Standard	—	100 μ l	—
样品	—	—	100 μ l
SDS Solution	100 μ l	100 μ l	100 μ l
TBA Solution	200 μ l	200 μ l	200 μ l

2. 如上表所示，各管加入 100 μ l 的 SDS Solution。
3. 如上表所示，各管加入 200 μ l 的 TBA Solution。
4. 将离心管置于 95°C 水浴或金属浴反应 30 分钟，然后冰浴冷却。
5. 将离心管 4°C、10000 g 离心 10 分钟，各管取 200 μ l 上清至 96 孔板中，比色法利用酶标仪测定 535nm 波长吸光度，荧光法测定 ex535nm-em553nm 的荧光值。

数据处理

利用 MDA 标准品的浓度为横坐标，吸光度值或荧光值为纵坐标制作标准曲线，然后利用样品测定中的吸光度值或荧光值计算样品的 MDA 浓度。通过比色法和荧光法测定 MDA 标曲结果如下图所示：



参考文献

1. Armstrong D., Browne R., 1994. The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. Adv. Exp. Med. Biol. 366: 43-58.
2. Yagi K., 1994. Lipid peroxides and related radicals in clinical medicine. Adv. Exp. Med. Biol. 366: 1-15.