

脂质氧化(MDA)检测试剂盒

Lipid Oxidation(MDA) Detection Kit

使用说明书

◆货号及规格:

目录编号	包装规格
C207-01	100T
C207-02	500T

◆产品组成:

试剂盒组分	C207-01	C207-02
TBA	25 mg	125 mg
TBA 配制液	6.76 mL	40 mL
TBA 稀释液	15 mL	100 mL
抗氧化剂	0.3 mL	1.5 mL
标准品(1mM)	0.2 mL	1 mL

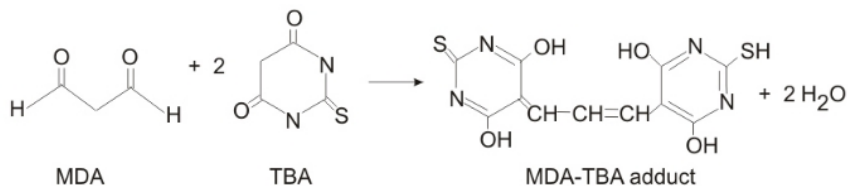
◆储存条件: 4°C运输, -20°C避光保存, 尽量避免反复冻融, 有效期 12 个月。

◆产品介绍:

脂质氧化(MDA)检测试剂盒采用一种基于丙二醛(Malondialdehyde, 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(Lipidperoxidation)水平检测的试剂盒。

MDA 是一种生物体脂质氧化的天然产物。动物或植物细胞发生氧化应激(Oxidativestress)时, 会发生脂质氧化。一些脂肪酸氧化后逐渐分解为一系列复杂的化合物, 其中包括 MDA。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, 例如血栓素合成酶(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，反应原理如下：



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。

本试剂盒中采用了特殊的抗氧化剂，可以有效地抑制样品在检测过程中产生新的 MDA，并且可以把部分 MDA 天然形成的聚丙烯二醛分解成 MDA 使检测更加准确。

本试剂盒可以检测低达 1 μ M 的 MDA，也可检测高达 200 μ M 的 MDA(参考图 1)。血浆、血清样品中的 MDA 含量通常在约 2-4 μ M，尿液中的 MDA 含量通常在约 5-30 μ M，在本试剂盒的检测范围内，可以直接用本试剂盒检测血浆、血清、尿液样品等。

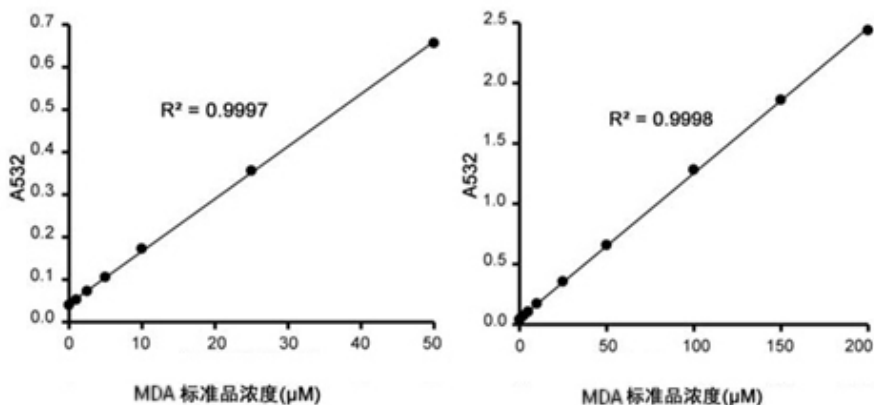


图 1.不同浓度标准品使用本试剂盒的检测效果图。实测数据会因检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

◆使用方法：

一、样品的准备：

1. 血浆、血清或尿液样品制备后可以直接用于 MDA 测定。
2. 组织或细胞可以使用 PBS 或裂解液进行匀浆或裂解。对于组织，组织重量占匀浆液或裂解液的比例为 10%；对于细胞，每 1×10^6 的细胞使用 0.1ml 裂解液或匀浆液。

匀浆或裂解后，10,000g-12,000g 离心 10 分钟取上清用于后续测定。对于一些特殊样品，离心不能获得澄清的上清溶液的，可以使用 0.2 μ m 孔径的过滤器过滤以获得澄清的样品溶液。匀浆或裂解等样品制备步骤建议在冰浴或 4 $^{\circ}$ C 进行操作。样品准备完毕后建议用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度，便于后续计算单位蛋白重量组织或细胞内的 MDA 含量。

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	试剂类别	化学成分
缓冲试剂	Borate(\leq 50mM)	抑制剂/螯合剂	Antipain(\leq 100 μ g/ml)
	HEPES(\leq 100mM)		Chymostatin(\leq 10 μ g/ml)
	Phosphate(\leq 100mM)		Leupeptin(\leq 10 μ g/ml)
	Tris(\leq 25mM)		PMSF(\leq 200 μ M)
去垢剂	CHAPS(\leq 1%)		Trypsin(\leq 10 μ g/ml)
	TritonX-100(\leq 1%)		EDTA(\leq 1mM)
	Tween20(\leq 1%)		EGTA(\leq 1mM)
其它试剂	Sucrose(250mM)(不建议使用)		
	Glycerol(\leq 10%)		

二、试剂盒的准备工作：

1. TBA 储存液的配制：称取适量 TBA，用 TBA 配制液配制成浓度为 0.37% 的 TBA 储存液。例如 18.5mg TBA 用 5ml TBA 配制液配制，或者 25mg TBA 用 6.76ml TBA 配制液配制，最终浓度即为 0.37%。TBA 配制液需完全溶解后再使用，可以加热到 70 $^{\circ}$ C 以促进溶解。TBA 储存液较难溶解，需加热到 70 $^{\circ}$ C，并通过剧烈涡旋振荡以促进溶解。配制好的 TBA 储存液室温避光保存，至少 3 个月内有效。
2. MDA 检测工作液的配制：根据待测定的样品数(含对照)，参考下表在临检测前新鲜配制适量的 MDA 检测工作液。

检测样品数	1	10	20	50
TBA 稀释液	150uL	1500uL	3000uL	7500uL
TBA 储存液	50uL	500uL	1000uL	2500uL
抗氧化剂	3uL	30uL	60uL	150uL

注：MDA 检测工作液较难溶解，可以 70 $^{\circ}$ C 加热，并剧烈涡旋振荡以促进溶解。也可以通过超声处理以促进溶解。配制好的 MDA 检测工作液必须当天使用。

3. 标准品的稀释：取适量标准品用蒸馏水稀释至 1、2、5、10、20、50 μ M，用于后续制作标准曲线。如果样品中 MDA 的浓度很高，可以增加 100、150 和 200 μ M 的标准品浓度。

三、样品测定：

1. 在离心管或其它适当容器内加入 100 μ l 匀浆液、裂解液或 PBS 等适当溶液作为空白对照，加入 100 μ l 上述不同浓度标准品用于制作标准曲线，加入 100 μ l 样品用于测定；随后加入 0.2ml MDA 检测工作液。可参考下表设置检测反应体系：

	样品	标准品	空白对照
待测样品	100 μ l	—	—
标准品	—	100 μ l	—
MDA 检测工作液	200 μ l	200 μ l	200 μ l
匀浆液、裂解液或 PBS	—	—	100 μ l

2. 混匀后，100 $^{\circ}$ C或沸水浴加热 15 分钟。加热时务必注意避免液体暴沸溅出。如果使用加热块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，或用封口膜封住离心管口，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 0.5mlPCR 管的 PCR 仪。
3. 水浴冷却至室温，1000xg 室温离心 10 分钟。取 200 μ l 上清加入到 96 孔板中，随后用酶标仪在 532nm 测定吸光度。如果不方便测定 532nm 的吸光度，也可以测定 530-540nm 之间的吸光度。可以设定 450nm 为参考波长进行双波长测定。
4. MDA 含量的计算：对于血浆、血清或尿液等样品可以直接根据标准曲线计算获得 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 μ mol/mg 蛋白或 μ mol/mg 组织。

◆注意事项：

1. 如果没有检测到 MDA，可能样品中 MDA 浓度过低，在检测组织或细胞的 MDA 时，请使用更多的组织或细胞，不要稀释样品。
2. 醛以及较高浓度的可溶性糖(例如 250mM 蔗糖/葡萄糖)对反应有干扰，可溶性糖与 TBA 显色反应的产物在 532nm 也有吸收(最大吸收在 450nm)。如果可溶性糖对测定有干扰，可以通过测定 450nm 作为参考波长进行双波长测定，消除其干扰。
3. 为了您的安全和健康，请穿戴实验服并戴一次性手套操作。
4. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或药品等用途。

=====



扫码关注我们