

脂质氧化(MDA)检测试剂盒 (TBA 法)

Lipid Peroxidation MDA Assay Kit (TBA Method)

货号: K084

规格: 100T/500T

试剂盒组份:

Reagents	100T	500T	Storage
TBA	25mg	125mg	-20°C , away from light
TBA solvent (TBS 配制液)	6.76mL	35mL	-20°C
TBA Diluent (TBA 稀释液)	15mL	75mL	-20°C
Antioxidant (抗氧化剂)	300 μ L	1.5mL	-20°C , away from light
Standard (1mM) (标准品)	200 μ L	1.mL	-20°C

保存条件:

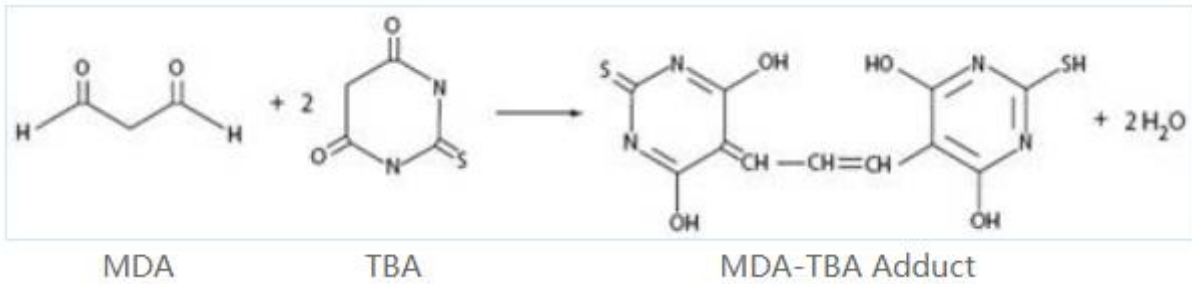
-20°C 避光保存一年。TBA, TBA solvent, TBA Diluent 三个试剂可室温或 4°C 存放三个月。

实验原理:

脂质氧化(MDA)检测试剂盒(Lipid Peroxidation MDA Assay Kit)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)水平检测的试剂盒。

丙二醛(Malondialdehyde,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 (oxidative stress)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 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。

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, 相应的反应原理图如下:



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。

实验步骤：

一、样本准备

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 或其他细胞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 100 万细胞使用 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 微米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宜在冰浴或 4℃ 进行操作。

3. 对于组织或细胞样品，样品准备完毕后可以用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(K001)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。

二、试剂盒准备工作

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℃ 以促进溶解。TBA 储存液较难溶解，需加热到 70℃，并通过剧烈 Vortex 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。

检测次数	1 次	10 次	20 次	50 次
TBA 稀释液	150 μL	1500 μL	3000 μL	7500 μL
TBA 储存液	50 μL	500 μL	1000 μL	2500 μL
抗氧化剂	3 μL	30 μL	60 μL	150 μL

注意：MDA 检测工作液较难溶解，可以 70℃ 加热，并剧烈 Vortex 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 μM ，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 μM 的标准品浓度。

三、样本测定

1. 在离心管或其它适当容器内加入 0.1ml 匀浆液、裂解液或 PBS 等适当溶液作为空白对照，加入 0.1ml 上述不同浓度标准品用于制作标准曲线，加入 0.1ml 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：

	空白对照	标准品	样品
匀浆液、裂解液或 PBS	0.1mL	-	-
标准品	-	0.1mL	-
待测样品	-	-	0.1mL
MDA 检测工作液	0.2mL	0.2mL	0.2mL

2. 混匀后，100℃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(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 0.5ml PCR 管的 PCR 仪。

3. 水浴冷却至室温，1000g 室温离心 10 分钟。取 200 微升上清加入到 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 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 蛋白或 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 组织。

注意事项:

1. 醛、较高浓度的可溶性糖(例如 250mM 蔗糖)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。
2. 为了您的安全和健康，请穿上实验服，戴上一次性手套。
3. 本产品仅供科学研究使用。