

脂质氧化 (MDA) 检测试剂盒

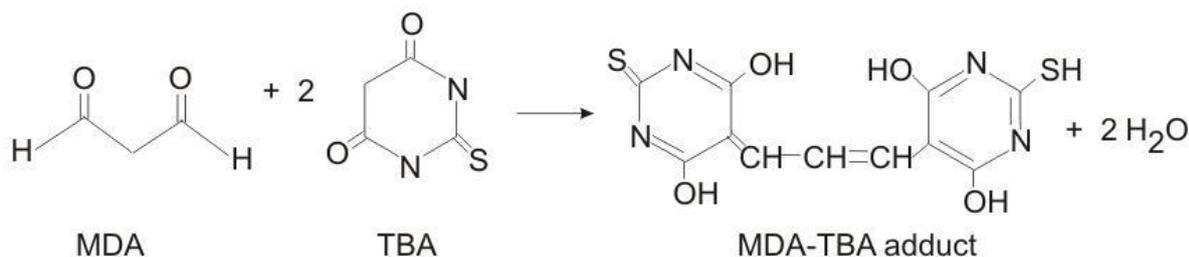
产品编号	产品名称	包装规格
NBS9041-100T	脂质氧化 (MDA) 检测试剂盒	100T

产品简介:

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 (lipid peroxidation) 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 (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, 例如血栓素合成酶 (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, 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至 1 μM 的 MDA, 也可检测高达 200 μM 的 MDA (参考图 1)。血浆、血清样品中的 MDA 含量通常在约 2-4 μM , 尿液中的 MDA 含量通常在约 5-30 μM , 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。

本产品仅用于生命科学研究, 不得用于医学诊断及其它用途!

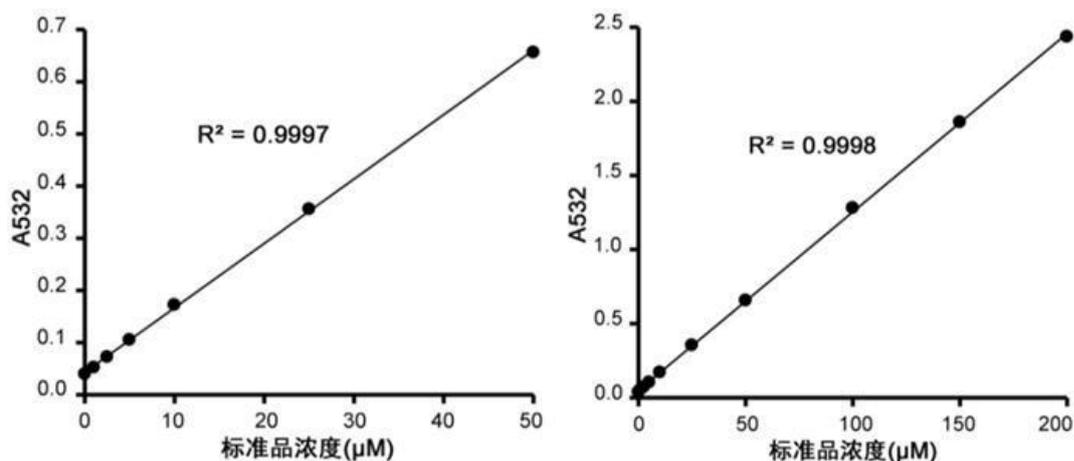


图 1. 不同浓度标准品使用本试剂盒的检测效果图。实测数据会因检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

保存条件:

-20°C避光保存，有效期一年。

产品组成:

编号	组分	规格
1	TBA	25 mg
2	TBA 稀释液	15 ml
3	抗氧化剂	0.3 ml
4	标准品 (1mM)	0.2 ml

产品使用:

一、样品的准备:

(a) 血浆、血清或尿液样品制备后可以直接用于 MDA 测定。

(b) 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 0.2μm 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°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 MDA 含量。

(c) 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 ($\leq 50\text{mM}$)	抑制剂/螯合剂	Antipain ($\leq 100\mu\text{g/ml}$)	
	HEPES ($\leq 100\text{mM}$)		Chymostatin ($\leq 10\mu\text{g/ml}$)	
	Phosphate ($\leq 100\text{mM}$)		Leupeptin ($\leq 10\mu\text{g/ml}$)	
	Tris ($\leq 25\text{mM}$)		PMSF ($\leq 200\mu\text{M}$)	
去垢剂	CHAPS ($\leq 1\%$)		Trypsin ($\leq 10\mu\text{g/ml}$)	
	Triton X-100 ($\leq 1\%$)		EDTA ($\leq 1\text{mM}$)	
	Tween 20 ($\leq 1\%$)		EGTA ($\leq 1\text{mM}$)	
其它试剂	Sucrose (250mM)(不建议使用)			
	Glycerol ($\leq 10\%$)			

二、试剂盒的准备工作：

(a) TBA 储存液的配制：称取适量 TBA，用冰乙酸（用户自备）配制成浓度为 0.37% 的 TBA 储存液。例如 18.5mg TBA 用 5ml 冰乙酸配制，或者 25mg TBA 用 6.76ml 冰乙酸配制，最终浓度即为 0.37%。TBA 储存液较难溶解，需加热到 70°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。

(b) 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	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

(c) 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、样品测定：

(a) 在离心管或其它适当容器内加入 100 μl 匀浆液、裂解液或 PBS 等适当溶液作为空白对照，加入 100 μl 上述不同浓度标准品用于制作标准曲线，加入 100 μl 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	—	—	200 μ l

(b) 混匀后, 100°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 0.5ml PCR 管的 PCR 仪。

(c) 水浴冷却至室温, 1000g 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。

(d) 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、冰乙酸, 即 TBA 配制液需用户自备。
- 2、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。
- 3、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。
- 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。