

细胞脂质氧化(MDA)检测试剂盒(TBA微板法)

产品货号: BA2295

产品规格: 100T/500T

产品简介:

动物或植物细胞发生氧化应激(oxidative stress)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。

尚宝细胞脂质氧化(MDA)检测试剂盒(TBA微板法)是采用一种基于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, 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。本试剂盒仅用于科研领域, 不宜用于临床诊断或其他用途。

产品组成

试剂名称	100T	500T	保存条件
试剂(A): TBA	100mg	500mg	室温, 避光
试剂(B): TBA稀释液	10ml	50ml	室温
试剂(C): 抗氧化剂	0.5ml	2.5ml	-20℃, 避光
试剂(D): MDA标准品(1mmol/L)	0.2ml	1ml	-20℃, 避光
试剂(E): MDA检测液	9ml	45ml	室温
试剂(F): MDA分离液	25ml	125ml	室温

自备材料:

1. 生理盐水或PBS
2. 离心管、离心机、96孔板、酶标仪或分光光度计、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 10^6 个细胞使用0.1ml裂解液或匀浆液。匀浆或裂解后, 4℃8000~12000g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℃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	是否干扰
缓冲液	HEPES(100mM)	否
	Borate (50mM)	否
	Phosphate (100mM)	否
	Tris (25mM)	否



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzybio@126.com

去垢剂	CHAPS ($\leq 1\%$)	否
	Triton X-100 ($\leq 1\%$)	否
	Tween 20 ($\leq 1\%$)	否
抑制剂/螯合剂	PMSF ($\leq 200\mu\text{M}$)	否
	EDTA ($\leq 1\text{mM}$)	否
	EGTA ($\leq 1\text{mM}$)	否
	Antipain ($\leq 100\mu\text{g/ml}$)	否
	Chymostatin ($\leq 10\mu\text{g/ml}$)	否
	Leupeptin ($\leq 10\mu\text{g/ml}$)	否
其他	Trypsin ($\leq 10\mu\text{g/ml}$)	否
	Glycerol ($\leq 10\%$)	否
	Sucrose (250mM)	是

- 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34mg TBA用5ml TBA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°C促溶，并可通过反复剧烈Vortex促溶。配制好的TBA工作液4°C避光保存，至少1个月内有效。
- 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 μM (如果进行简易快速检测，标准品直接稀释10 μM)。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°C避光保存，至少3个月内有效。
- 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	75 μl	750 μl	1500 μl
抗氧化剂	3.1 μl	31 μl	62 μl
MDA检测液	7.5 μl	75 μl	150 μl
MDA分离液	225 μl	2250 μl	4500 μl
总体积	310.6 μl	3106 μl	6212 μl

- MDA加样：在离心管或其它适当容器内加入8 μl 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8 μl 上述不同浓度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 μM 的标准品)，加入8 μl 样品用于测定；随后加入300 μl MDA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(μl)	空白管	标准管	测定管
匀浆液、裂解液、PBS、生理盐水等	8	-	-
标准品	-	8	-
待测样品	-	-	8
MDA检测工作液	300	300	300

混匀，加盖，95°C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(Heat block)进行加热注意重物压紧离心管盖；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。

- MDA测定：水浴或流水冷却至室温，3000r/min离心15min或4000gr/min离心10min。取上清，其颜色为黄色至棕红色，蒸馏水调零，用酶标仪测定535nm处吸光度，如果不方便也可以测定530~540nm之间的吸光度，分别记为 $A_{\text{空白}}$ 、 $A_{\text{标准}}$ 、 $A_{\text{测定}}$ 。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

计算:

如果进行简易快速检测, 直接以 $10\mu\text{M}$ 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 $\mu\text{mol/g}$ 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:

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

简易快速细胞、组织样品中MDA含量计算公式:

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

式中: $\text{A}_{\text{测定}}$ = 测定孔的吸光度

$\text{A}_{\text{标准}}$ = 标准孔的吸光度

$\text{A}_{\text{空白}}$ = 空白孔的吸光度

参考区间: 健康成年人血清MDA: $9.58 \pm 2.15 \mu\text{mol/L}$

健康成年人血浆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 $100\mu\text{l}$; 低密度脂蛋白悬液取 $100-200\mu\text{l}$; 食用油取 $30\mu\text{l}$; 肝脏、心肌、肌肉等, 取5%或10%匀浆 $100-200\mu\text{l}$ 。
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°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。
6. 试剂开封后请尽快使用, 以防影响后续实验效果。

有效期: 12个月有效。 4°C 运输, -20°C 保存。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com