

微量丙二醛 (MDA) 测试盒说明书(精简版)

(货号:A003-2 TBA 比色法)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验,否则由此导致的后果用户自行承担!

本试剂盒是在原MDA试剂盒针对一些含量较少的样本(比如培养细胞及细胞上清)测试效果不是太好的基础上改进的一种更为灵敏、简便的测试方法。

一、测试原理:

过氧化脂质降解产物中的丙二醛 (MDA) 可与硫代巴比妥酸 (TBA) 缩合,形成红色产物,在 532nm 处有最大吸收峰。因底物为硫代巴比妥酸 (Thiobarbituric Acid TBA) 所以此法称 TBA 法。

二、测试所需仪器耗材和试剂:

含 532nm 波长的分光光度计及 1cm 光径比色皿 (或酶标板及 96 孔板)、95℃ 水浴锅、电炉 (配试剂加热用)、台式低速离心机、各种规格移液器、双蒸水、无水乙醇、生理盐水 (0.9%) 或 PBS (0.1M)、冰醋酸 (分析纯, 乙酸浓度≥99.5%)、涡旋混匀器、离心管、蛋白测定试剂 (组织及细胞样本用, 本公司有售)。

三、试剂盒组成与配制:(试剂盒有效期 1 年)

试剂组分	50 管/24 样 货号 A003-2-1	100 管/48 样 货号 A003-2-2	保存条件
试剂一	液体 10mL×1 瓶	液体 20mL×1 瓶	4℃
试剂二	液体 6mL×1 瓶	液体 12mL×1 瓶	4℃
	用时按 6:170 的体积比加双蒸水混合。 (可一次性配完)		4℃
试剂三	粉剂×1 支	粉剂×1 支	4℃避光
	用时将粉剂加到 32mL 双蒸水中, 加热到 90℃~100℃, 充分溶解后再加冰醋酸 30mL	用时将粉剂加到 62mL 双蒸水中, 加热到 90℃~100℃, 充分溶解后再加冰醋酸 60mL	避光, 室温或 4℃
标准品	10nmol/mL 四乙氧基丙烷 5mL×1 瓶		4℃

四、规范操作方法:

1、样本前处理:

血清(浆)样本: 直接使用;

细胞培养液样本: 取部分 3500rpm/分钟离心 10 分钟后取上清待测;

组织样本: 称取组织重量, 按照重量 (g): 体积 (mL)=1:9 的比例加入 9 倍体积生理盐水, 剪碎组织, 冰水浴制备成匀浆液待测 (匀浆液也可 3500rpm/分钟离心 10 分钟后取上清 (10% 匀浆上清) 测定, 此时上清液需要同时测定其蛋白浓度, 计算时用公式 (3)) ;

培养细胞样本:

收集细胞: ①、悬浮培养的细胞, 可直接通过离心收集沉淀细胞 (1000 转/分, 离心 10 分钟, 弃上清留沉淀细胞); ②、贴壁培养的细胞, 吸去上清, 可通过细胞刮直接将细胞刮下; 或者是用 0.25% 的胰酶室温消化 2~3 分钟, 加培养液终止消化, 用微量移液器轻轻吹打, 将所有液体吸出转入 EP 管, 然后 1000 转/分, 离心 10 分钟弃上清, 留沉淀细胞, 再加入 1mL PBS 轻轻吹打, 再次 1000 转/分, 离心 10 分钟弃上清, 留沉淀细胞待用。如暂时不做, 则可以将细胞低温冻存, 温度越低越好。

细胞破碎: (以下任选一种) (破碎后可以用本所的 BCA 或考马斯亮蓝试剂盒测定蛋白浓度, 用于计算)

①、**研磨破碎:** 在细胞沉淀中加入一定量 (10⁶ 数量级的细胞一般加 0.3~0.5mL) 的缓冲液 (缓冲液可以用 PBS 或者是生理盐水), 用手动玻璃匀浆器冰水浴研磨 3~5 分钟, 或者是用卡富隆电动研磨器冰水浴研磨 3 分钟待测;

②、**超声破碎:** 在细胞沉淀中加入一定量 (10⁶ 数量级的细胞一般加 0.3~0.5mL) 的缓冲液 (缓冲液可以用 PBS 或者是生理盐水), 需保证超声探头在液面以下。功率 300W, 冰水浴, 每 3~5S 超声一次, 间隔 4 次 (每次间隔时间为 30S 左右); (推荐此法)

③、**反复冻融:** 可以用液氮进行反复冻融, 让细胞在 EP 管或者是冻存管中加入一定量的低渗液或者蒸馏水, 直接放入液氮中 3~5 秒, 立即提出转入 -20℃ 冰箱 (20~30 秒), 再取出室温解冻, 解冻后再按前面重复 3 次。(注意从液氮中取出不可直接置于室温解冻, 这样 EP 管等容易炸裂导致样本损失, 所以一定要用冷冻进行梯度解冻);

④ **化学裂解:** 贴壁培养的细胞, 可直接将上清吸去后, 直接在孔板或是瓶中加入一定量的裂解液 (推荐用 1%-2% 的 Triton X-100, 覆盖满细胞), 置冰上裂解 30~40 分钟 (可用显微镜观察细胞破碎情况, 如效果不好可延长延长时间), 再用微量移液器吸出待测。

2、操作表:

	空白管	标准管	测定管	对照管
10nmol/mL 标准品 (mL)		0.2		
无水乙醇 (mL)	0.2			
测试样品 (mL)			0.2	0.2
试剂一 (mL)	0.2	0.2	0.2	0.2
混匀 (摇动几下试管架)				
试剂二 (mL)	3	3	3	3
试剂三 (mL)	1	1	1	
50% 冰醋酸 (mL)				1

离心管盖上盖, 旋涡混匀器混匀, 用针头在盖上刺一小孔, 95℃ 水浴 (或用锅开盖煮沸) 40 分钟, 取出用自来水冷却, 4000rpm/min 常温离心 10min, 取上清 532nm 处, 1cm 光径, 双蒸水调零, 测各管吸光度值 A (酶标仪读数时, 只需吸取 0.2mL 反应液加入到 96 孔板中, 532nm 处读数)。

注: ①、对照管每个样本都需要做, 表内所有试剂可以按比例增大或缩小, 结果不变。

②、细胞匀浆液或细胞培养上清液可上样 0.3~0.4mL。

③、规范操作方法标准管参考吸光度: 标准管吸光度减去空白管的吸光度为 0.130~0.140 (1cm 光径), 用酶标仪读数时, 此值在 0.075~0.090。

④、预试时, 若发现检测样本吸光度太低, 正式实验时可以将水浴时间 40 分钟延长至 80 分钟, 但同一课题中 MDA 的水浴都必须用 80 分钟, 以免造成批间差异。

3、计算公式:

(1)、血清(浆)、细胞培养液中 MDA 含量计算公式:

$$\text{MDA 含量 (nmol/mL)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}}$$

(2)、组织中 MDA 含量计算公式:

$$\text{MDA 含量 (nmol/g 组织)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \frac{W}{V_{\text{样总}}}$$

(3)、细胞或组织匀浆上清中 MDA 含量计算公式:

$$\text{MDA 含量 (nmol/mg prot)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$$

注: C_{标准}: 标准品浓度, 10nmol/mL;

W: 组织重量, g;

V_{样总}: 组织匀浆时加入的生理盐水的总体积, mL;

C_{pr}: 匀浆 (上清) 蛋白浓度, mgprot/mL (prot 指蛋白)。

五、简便操作方法：**1、混合试剂的配制：**

工作液 I 的配制：试剂一：试剂二：试剂三=0.2:3:1, 现用现配；
工作液 II 的配制：试剂一：试剂二：50%冰醋酸=0.2:3:1, 现用现配。

2、简便操作表：

	空白管	标准管	测定管	对照管
10nmol/mL 标准品 (mL)		0.2		
无水乙醇 (mL)	0.2			
测试样品 (mL)			0.2	0.2
工作液 I (mL)	4	4	4	
工作液 II (mL)				4

离心管盖上盖，旋涡混匀器混匀，用针头在盖上刺一小孔，95℃水浴（或用锅开盖煮沸）40分钟，取出用自来水冷却，4000rpm/min 常温离心 10min，取上清 532nm 处，1cm 光径，双蒸水调零，测各管吸光度值。（计算公式不变）

* 对照管每个样本都需要做，表内所有试剂可以按比例增大或缩小，结果不变。

注 1：以上规范操作法及简便操作法适用于人及各种动植物的样本（包括血清、动植物组织及体液、细胞及细胞培养液等）。

注 2：规范操作法及简便操作法中，若发现检测样本吸光度太低，可以将水浴时间 40 分钟延长至 80 分钟，但您的同一课题中 MDA 的检测都必须延长至 80 分钟，以免造成批间差异。

六、测定意义：

机体通过酶系统与非酶系统产生氧自由基，后者能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸（polyunsaturated fatty acid, PUFA），引发脂质过氧化作用，并因此形成脂质过氧化物。如：醛基（丙二醛 MDA）、酮基、羟基、羰基、氢过氧基或内过氧基，以及新的氧自由基等。脂质过氧化作用不仅把活性氧转化成活性化学剂，即非自由基性的脂类分解产物，而且通过链式或链式支链反应，放大活性氧的作用。因此，初始的一个活性氧能导致很多脂类分解产物的形成，这些分解产物中，一些是无害的，另一些则能引起细胞代谢及功能障碍，甚至死亡。氧自由基不但通过生物膜中多不饱和脂肪酸（PUFA）的过氧化引起细胞损伤，而且还能通过脂氢过氧化物的分解产物引起细胞损伤。因而测试 MDA 的量常常可反映机体内脂质过氧化的程度，间接地反映出细胞损伤的程度。

MDA 的测定常常与 SOD 的测定相互配合，SOD 活力的高低间接反应了机体清除氧自由基的能力，而 MDA 的高低又间接反应了机体细胞受自由基攻击的严重程度，通过 SOD 与 MDA 的结果分析有助于医学、生物学、药理及工农业生产的发展。

七、注意点：

- 1、本实验也可在最后离心后，取上清 200-300 μ L 加到 96 孔板中，酶标仪 532nm 处读数，计算公式不变。
- 2、配制试剂时要充分混匀。测试过程中第一管吸的试剂要丢弃，加样品或试剂时要垂直加，不要加在管壁上。95℃水浴前要充分混匀。
- 3、水浴时间及温度要固定。没有水浴锅的单位可用铝锅、铝盒、铝盆等开盖煮沸即可。
- 4、高脂样本操作时，离心沉淀一定要充分，否则影响吸光度，造成结果不稳定。这种情况可在水浴后向反应液中加入 0.1-0.2ml 的氯仿，涡旋混匀 1-3 分钟后再离心。
- 5、冬天若发现测试溶液呈雾状可以轻轻放水浴箱稍稍加温，待溶液溶解呈透明状态用移液器吸取放入比色杯中，若仍然呈雾状，则考虑为高脂血症。
- 6、样本取样量：若您的样量较多（样本 MDA 含量较低时），取样量可以加倍，抽提过程中，双蒸水、无水乙醇、氯仿均要加倍。若您的样本为贫血病人的血样，则取样量也要加倍，抽提过程中，双蒸水、无水乙醇、氯仿的量则不变。

- 7、本实验最好用带盖的试管或离心管操作，以免反应液的蒸发。若没有带盖的试管可用冰箱保鲜膜盖好，用橡皮筋扎好后在保鲜膜上用针刺一小孔即可代替盖子。

八、本试剂盒优点：

- 1、本试剂盒中试剂均无刺激性气味，对操作人员无任何毒害。
- 2、快速准确，操作简便，每小时可测 100 例以上样本。
- 3、灵敏度高，血清或血浆样品只需 0.1mL, 或者更少。
- 4、再现性好，变异系数 CV=2.0%，同一份标本数次测试结果相差极微。
- 5、呈色稳定，呈色后半天内测吸光度不变。
- 6、试剂稳定，保质期一年；试剂三配制后避光室温保存至少 3 个月（颜色变成咖啡色即不可使用）。
- 7、血清样品放置 4℃，3~5 天内测试结果不变。-70℃以下可保存 3 个月至半年。
- 8、测试面广，可测血清（浆）、各种组织匀浆，培养细胞等。
- 9、主要原料均为进口，但价格适中。
- 10、不需昂贵与特殊仪器，只需恒温水浴箱或者铝锅、铝盆开盖煮沸，及 721、722、751、752 分光光度计或各种含有 532nm（ \pm 10nm）的酶标仪任一型号均可。
- 11、不受气温等外界因素的影响。是目前国内最稳定的 MDA 测试方法。