

液体样本丙二醛 (MDA) 检测试剂盒

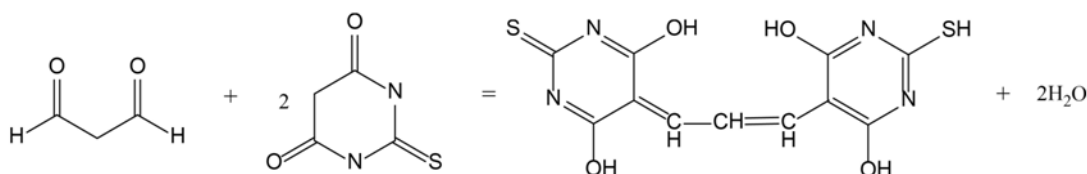
E2009

描述: 液体样本丙二醛 (MDA) 检测试剂盒是一种灵敏简单的检测脂质过氧化产物丙二醛的试剂盒。

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, 通过检测 MDA 的水平可评价脂质氧化的水平, 因此 MDA 的测定被广泛用作脂质氧化的指标。

本试剂盒是一种基于 MDA 和硫代巴比妥酸 (thiobarbituric acid, TBA) 在较高温度和酸性环境中反应生成红色 MDA-TBA 加和物, MDA-TBA 加和物在 535nm 波长具有最大吸收, 据此可以通过比色法进行检测。另外 MDA-TBA 受 535nm 波长激发光激发, 在 553nm 波长发出荧光, 因此, 可以通过荧光法检测 MDA 浓度。荧光法相对比色法灵敏度提高一个数量级。

反应示意图如下:



试剂盒以比色法检测线性范围为 1.56-50 μM , 灵敏度 $\leq 1.56 \mu\text{M}$; 荧光法检测线性范围为 0.156-5 μM , 灵敏度 $\leq 0.156 \mu\text{M}$

适用: 本试剂盒能够检测动物血浆、血清、尿液等液体样本中 MDA 含量。

组成:

组份名称	规格	数量
MDA 标准品 (1mM)	200 μl /管	1
TBA	50 mg/管	1
TBA 配制液	7.5 ml/瓶	1
SDS 溶液	12 ml/瓶	1
BHT 溶液 (100 \times)	1 ml/管	1

储存条件: -20 $^{\circ}\text{C}$ 储存, 一年有效。TBA 配制成溶液后, 可 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光储存一周。SDS 溶液使用前, 请恢复至室温并彻底溶解后使用, 首次使用后 4 $^{\circ}\text{C}$ 储存即可。

需要而未提供的试剂及器材

1. 超纯水
2. 0.1M PBS(PH7.0-7.4)和 EDTA
3. 系列可调节量程移液器及吸头

4. 干净的试管、离心管及 96 孔板

5. 酶标仪

操作步骤:

1. 样品的准备

血浆样品的准备: 取新鲜抗凝血液, 4°C, 1000g 离心 10 分钟, 上清为血浆。取上清用于 MDA 的测定不立即测定的样品可以-70°C 保存。

血清样品的准备: 取新鲜血液, 室温凝固 30min, 2000g 离心 10 分钟, 上清为血清。取上清用于 MDA 测定。不立即测定的样品可以-70°C 保存。

尿液样品的准备: 取新鲜尿液, 4°C 静置 30min 去除不溶物, 取上清用于 MDA 的测定。不立即测定的样品可以-70°C 保存。

2. 试剂盒的准备

2.1 TBA 溶液的配制: 将本试剂盒提供的 1 管 50 mg TBA 倒入 50 ml 离心管中, 再加入 7.5 ml TBA 配置震荡 2 分钟溶解 TBA, 然后加入 17.5 ml 的纯水, 彻底溶解 TBA, 可以超声助溶, 即为 TBA 溶液, 浓度为 2 mg/ml。

3. 标准品的准备

比色法标准品的配制: 在 1.5 ml 离心管中, 加入 950 μ l 纯水, 再取 50 μ l 的 1 mM 浓度 MDA 标准品加入离心管中配制 50 μ M 浓度 MDA 标准品; 然后取另外 5 根 1.5 ml 离心管, 分别加入 500 μ l 纯水, 再吸取 500 μ l 的 50 μ M 浓度 MDA 标准品依次倍倍稀释为 25、12.5、6.25、3.12、1.56 μ M 浓度。

荧光法标准品的配制: 在 1.5 ml 离心管中, 加入 1 ml 纯水, 再取 5 μ l 的 1 mM 浓度 MDA 标准品加入离心管中配制 5 μ M 浓度 MDA 标准品; 然后取另外 5 根 1.5 ml 离心管, 分别加入 500 μ l 纯水, 再将 500 μ l 的 5 μ M 浓度 MDA 标准品依次倍倍稀释为 2.5、1.25、0.625、0.312、0.156 μ M 浓度。

测定方法

1. 在 1.5 ml 离心管中, 按下表进行配制:

	空白管	标准品管	样品管	对照管
纯水	100 μ l			200 μ l
标准品		100 μ l		
待测样品			100 μ l	100 μ l
SDS 溶液	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
TBA 溶液	200 μ l	200 μ l	200 μ l	

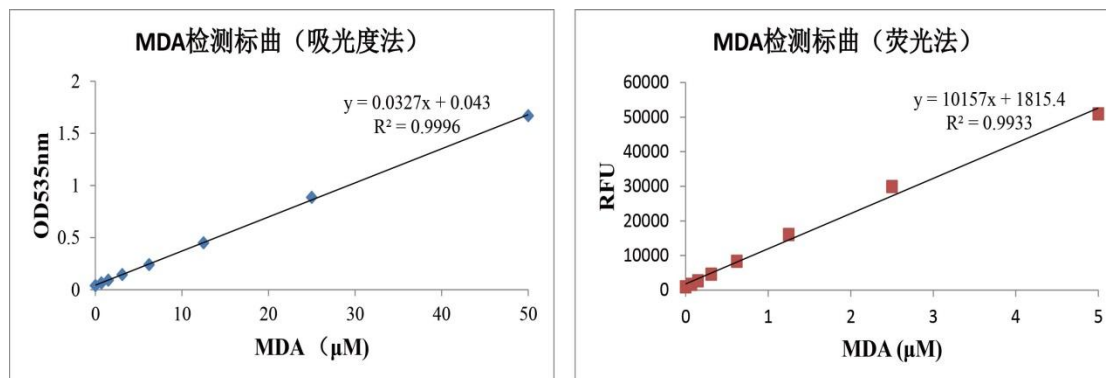
一般情况下, 对照管每批只需做 1-2 支, 若样本不存在溶血、脂血现象, 对照管可以不做。

2. 将离心管置于 95°C 水浴或金属浴反应 30 分钟, 然后冰浴冷却至室温。

3. 10000g 离心 10min, 取 200 μ l 上清溶液, 测定吸光度 (535nm) 或发射的荧光强度 (ex535nm-em553nm)。

数据处理

利用 MDA 标准品浓度为横坐标, 吸光度值或发射荧光值为纵坐标制作标准曲线, 并获得横纵坐标之间的函数关系式, 然后利用标准曲线和各样品的吸光度值或发射荧光值计算样品的 MDA 浓度。MDA 标准曲线测定结果如下图所示:



参考文献

1. Armstrong, D., and Browne, R. (1994). Free Radicals in Diagnostic Medicine. 366: 43-58.
2. Armstrong, D., et al. (1998). Free Radicals and Antioxidant Protocols. 108:315-324.
3. Yagi, K. (1998). Free Radicals and Antioxidant Protocols. 108: 101-106.

注意事项

1. 血红蛋白对测定有一定干扰, 请尽量避免血浆和血清制备过程中的溶血。
2. TBA 配制成溶液后不够稳定, 要在 4 $^{\circ}$ C 避光储存, 一周内用完。
3. 初次使用试剂盒时, 粉末试剂和小体积液体试剂请适当离心后使用。
4. 本产品仅限专业人员用于科学研究, 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。