

微量丙二醛 (MDA) 测试盒说明书

(货号:A003-2 TBA 比色法)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书, 测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、测试所需仪器和试剂:

可见光分光光度计或酶标仪, 可调到 95℃ 左右的恒温水浴箱或沸水浴锅, 离心机, 无水乙醇 (分析纯), 冰醋酸 (99.5% 以上浓度, 分析纯), 蒸馏水。

三、试剂组成与配制:(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	常温
试剂二	液体 6mL×1 瓶	液体 12mL×1 瓶	4℃
	用时按 6:170 的体积比加蒸馏水混合配成应用液。(也可一次性配完)		4℃
试剂三	粉剂×1 支	粉剂×1 支	4℃避光
	用时将粉剂加到 32mL 蒸馏水中, 搅拌并加热到 90℃~100℃, 充分溶解后再加冰醋酸 30mL 配成应用液	用时将粉剂加到 62mL 蒸馏水中, 搅拌并加热到 90℃~100℃, 充分溶解后再加冰醋酸 60mL 配成应用液	避光, 室温或 4℃
标准品	10nmol/mL 四乙氧基丙烷 5mL×1 瓶		4℃

注: 试剂一在冰箱冷藏时会凝固, 可 37℃ 隔水加热融化后使用。

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 1000 转/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 3500 转/分钟, 离心 10 分钟后取上清 (10% 匀浆上清) 测定 (动物组织匀浆上清液需要同时测定其蛋白浓度, 用公式 (3) 计算, 植物组织匀浆上清可不测蛋白, 用公式 (2) 计算);

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) (破碎后可以用本公司的 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, 每次超声 3~5 秒, 间隔时间为 30 秒左右 (重复 3-5 次); (推荐此法)

③、**反复冻融:** 可以用液氮进行反复冻融, 让细胞在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, 这样容易导致管炸裂使样本损失, 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
摇动试管或试管架混匀				
试剂二应用液 (mL)	3	3	3	3
试剂三应用液 (mL)	1	1	1	
50% 冰醋酸 (mL)				1

离心管盖上盖, 旋涡混匀器混匀, 用针在盖上刺一小孔 (或是不扎孔但用防爆夹固定好离心管盖), 95℃ 以上沸水浴 40 分钟, 取出用自来水冷却, 4000rpm 常温离心 10min, 取上清 532nm 处, 1cm 光径, 蒸馏水调零, 测各管吸光度值 A (或是每管吸出 0.2mL 反应液加入到 96 孔板中, 532nm 处酶标仪读数)。

注: ①、对照管每个样本都需要做, 表内所有试剂可以按比例适当增大或缩小, 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、反应完离心后的上清若因高脂导致不澄清, 可往反应液中加入 0.1mL 氯仿 (分析纯), 涡旋 1 分钟后再去离心。

④、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。

⑤、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 含量按重量计算公式:

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

(3)、组织(或细胞)中 MDA 含量按蛋白浓度计算公式:

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

(4)、细胞中 MDA 含量按细胞数计算公式:

$$\text{MDA含量 (nmol/10}^6\text{细胞)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \frac{\text{细胞总数}}{V_{\text{样总}}}$$

以上公式中:

$C_{\text{标准}}$: 标准品浓度, 10nmol/mL;

W : 组织重量, g;

$V_{\text{样总}}$: 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, mg/mL;

细胞总数: 指细胞破碎前收集到的细胞总数量, 10^6 个。

五、简便操作方法: (可节约操作时间)

1、混合试剂的配制:

工作液 I 的配制: 试剂一: 试剂二应用液: 试剂三应用液 = 0.2 : 3 : 1, 现用现配;

工作液 II 的配制: 试剂一: 试剂二应用液: 冰醋酸: 蒸馏水 = 0.2 : 3 : 0.5 : 0.5, 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, 用针在盖上刺一小孔 (或是不穿孔但用防爆夹固定好离心管盖), 95℃ 以上沸水浴 40 分钟, 取出用自来水冷却, 4000rpm 常温离心 10min, 取上清 532nm 处, 1cm 光径, 蒸馏水调零, 测各管吸光度值 A (或是每管吸出 0.2mL 反应液加入到 96 孔板中, 532nm 处酶标仪读数, 计算公式不变)

注意点: 同规范操作!

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、配制试剂时要充分混匀。95℃ 水浴前要充分混匀。
- 2、水浴时间及温度要固定。没有水浴锅的单位可用铝锅、铝盒、铝盆等煮沸反应来替代。
- 3、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。
- 4、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。
- 5、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, 蒸馏水、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, 蒸馏水、无水乙醇、氯仿的量

则不变。

- 6、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任何毒性, 对操作人员无毒害。
- 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 (± 10 nm) 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。