

丙二醛 (MDA) 检测试剂盒

简介:

氧自由基作用于脂质的不饱和脂肪酸, 生成过氧化脂质; 后者逐渐分解为一系列复杂的化合物, 其中包括丙二醛(MDA)。通过检测 MDA 的水平即可检测脂质氧化的水平。丙二醛(MDA)在酸性和高温条件下, 可以与硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA) 缩合, 生成棕红色的三甲川(3,5,5-三甲基恶唑-2,4-二酮), 其最大吸收波长在 532nm。进行比色后可估测样本中 MDA 的含量。

试剂盒组分:

试剂名称	规格: 48T	保存条件
样本稀释液	液体30mL×1瓶	2-8℃保存
试剂一	液体13mL×1瓶	2-8℃保存
试剂二	液体6mL×1瓶	2-8℃保存
试剂三	液体3mL×1瓶	2-8℃保存
试剂四	液体3mL×1瓶	2-8℃保存

本试剂盒可用于检测细胞、组织、血浆、血清、红血球、植物等样品。

样本处理:

- 血清样品: 将收集于血清分离管中的全血标本在室温放置2小时或4℃过夜, 然后1,000×g 离心15分钟, 取上清即可, 将上清置于≤-20℃冷冻保存, 避免反复冻融。
- 血浆样品: 用 EDTA或肝素钠抗凝管采集标本, 并将标本在采集后的 30 分钟内于 4℃冰箱, 1,000×g 离心15分钟, 取上清即可检测, 或将上清置于≤-20℃冷冻保存, 避免反复冻融。
- 组织匀浆:
 - 在预冷 PBS(0.01mol/L, pH=7.0-7.2) 中清洗去除血液, 低温切割标本后, 准确称取组织重量。
 - 按重量(g): 体积(mL)=1:9的比例, 加入9倍体积的匀浆介质PBS。用手工或匀浆器将标本充分匀浆。
 - 3000 ×g离心15分钟, 仔细收集匀浆上清, 弃沉淀, (如需要可取部分进行BCA蛋白定量), ≤-20℃以下保存。
- 细胞裂解液: 在分析试验之前, 细胞需利用以下方法处理:
 - 贴壁细胞应该用冷 PBS 轻轻清洗, 然后用胰蛋白酶消化, 于 1,000×g 离心 5 分钟后收集, (悬浮细胞通过离心直接收集), 将收集到的细胞用冷 PBS 洗3次。
 - 用 PBS 稀释细胞悬液, 细胞浓度达到 100 万/ml 左右。通过超声破碎或反复冻融方式, 以使细胞破坏并放出细胞内成份。3000 ×g离心15分钟, 仔细收集上清, ≤-20℃冷冻保存。
- 细胞培养上清或其它生物体液标本: 请 3,000×g 离心15分钟, 取上清即可检测, 或将上清置于≤-20℃冷冻保存, 避免反复冻融。

二、检测步骤：

- 1、可见分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至532nm、600nm，可见分光光度计用蒸馏水调零。
- 2、在EP管按下表步骤加样：（务必先阅读操作表内“注意”事项）

试剂名称(μL)	测定管	空白管
试剂一	200	200
样本	100	—
蒸馏水	—	100
试剂二	100	100
试剂三	50	50
试剂四	50	50

充分混匀，在100℃水浴中保温60min后，置于冰浴中冷却，10000g，常温，离心10min。吸取200 μL上清液于微量玻璃比色皿或96孔板中，测定各样本在532nm和600nm处的吸光度。分别记为A532测定、A532空白、A600测定、A600空白，计算 $\Delta A532 = A532 \text{测定} - A532 \text{空白}$ ， $\Delta A600 = A600 \text{测定} - A600 \text{空白}$ ， $\Delta A = \Delta A532 - \Delta A600$ （空白管只需做1-2次）。

注意：

- 1、试剂三：低温下易有析出，可40℃孵育复溶；
- 2、高脂血或者油脂类样本在操作表中空白管的蒸馏水应以（66 μL蒸馏水+134 μL乙醇）代替；
- 3、上述反应混合液煮沸时，务必避免液体溅出，时刻注意安全。使用普通扣盖EP管可以用封口膜缠口后，使用针头在盖子上扎一小孔防止爆盖，更推荐使用带有螺旋口的EP管（也需缠膜），若使用金属浴加热也可用重物压紧管盖；
- 4、若气泡较多，建议离心后取上清液至另外的EP管中，静置1-3min至气泡消失后测定，避免气泡影响吸光；
- 5、若样本较多，可将试剂二、三、四按比例配制成工作液使用；
- 6、实验之前建议选择2-3个样本进行预实验；

三、计算方法：

A、按微量玻璃比色皿计算

(1) 按照蛋白浓度计算

$$\text{MDA 含量 (nmol/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样本}}) \times F = 32.258 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \times F$$

(2) 按照样本质量计算

$$\text{MDA 含量 (nmol/g 质量)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}}) \times F = 32.258 \times \Delta A \div W \times F$$

(3) 按照细菌或细胞数量计算

$$\text{MDA 含量 (nmol/10}^6\text{cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (N \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}}) \times F = 32.258 \times \Delta A \div N \times F$$

(4) 按照体积计算

$$\text{MDA 含量 (nmol/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div V_{\text{样本}} \times F = 32.258 \times \Delta A \times F$$

V 反应：反应体系总体积，5×10⁻⁴L；ε：MDA摩尔吸光系数，1.55×10⁵L/mol/cm；V 样本：加入样本体积，0.1mL；d：微量玻璃比色皿光径，1cm；V提取：加入提取液体积，1mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；N：细胞或细菌总数，以百万计；109：单位换算系数，1mol=109nmol；F：稀释倍数，高脂血或者油脂类样本需乘以稀释倍数。

B、按96孔板计算

(1) 按照蛋白浓度计算

$$\text{MDA 含量 (nmol/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样本}}) \times F = 53.763 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \times F$$

(2) 按照样本质量计算

Webset: www.jinhengnuo.com

Tel.: 18968009509, 18968000935, 18969978509

MDA 含量(nmol/g质量)=[$\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (e \times d) \times 109$] $\div (W \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}}) \times F = 53.763 \times \Delta A \div W \times F$

(3)按照细菌或细胞数量计算

MDA 含量(nmol/ 10^6 cell)=[$\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109$] $\div (N \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}}) \times F = 53.763 \times \Delta A \div N \times F$

(4)按照体积计算

MDA 含量(nmol/mL)=[$\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (e \times d) \times 109$] $\div V_{\text{样本}} \times F = 53.763 \times \Delta A \times F$

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 5×10^{-4} L; ϵ : MDA摩尔吸光系数, 1.55×10^5 L/mol/cm; $V_{\text{样本}}$: 加入样本体积, 0.1mL; d : 96孔板光径, 0.6cm; $V_{\text{提取}}$: 加入提取液体积, 1mL; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量, g; N : 细胞或细菌总数, 以百万计; 10^9 : 单位换算系数, $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$; F : 稀释倍数, 高脂血或者油脂类样本需乘以稀释倍数。

注意事项:

1. 若发现检测样本吸光值过低, 可以将沸水浴时间60min调整为90min 或者更长, 但同一实验中的MDA 的检测都需要延长到同一时间以免引起误差, 也可提高样本量重新提取或者操作表中加大样本体积加入量; 若 $\Delta A > 1.2$, 可用蒸馏水稀释样本后再进行测定。

