微量丙二醛（MDA）测定试剂盒

Micro-MDA Assay Reagent Kit

说明书修订日期：2015.07.13

Cat number：KGT003-1/KGT004-1

Store at 4℃ for 12 months

For Research Use Only（科研专用）

一. 试剂盒说明

本试剂盒是在原 MDA 试剂盒针对一些含量特少的样本（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。

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。

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（Thibabituric Acid TBA）所以此法称 TBA 法。

二. 检测所需仪器设备

可见光分光光度计，可调到 95℃左右的恒温水浴箱（或者铝锅内放几个去掉盖子的易拉罐，将罐壁及底部穿数十个孔，以便水的进入，用来代替水浴箱。）。

三. 试剂盒组份

组份	KGT003-1 50 assays	KGT004-1 100 assays	保存条件
Buffer A	10ml	20 mL	4℃
Buffer B	6ml	12ml	4℃冷藏
试剂 C	粉剂一瓶	粉剂一瓶	避光冷藏
标准品	5mL	5mL	4℃冷藏

注意事项

KGT004（100assays）：

1. Buffer B 用时每瓶加 340ml 双蒸水混匀，4℃冷藏。

2.试剂 C（显色剂）：用时将粉剂加入到 90℃~100℃的热双蒸水 60ml 中，（在溶解过程中可适当加热），充分溶解后用双蒸水补足至 60ml 再加冰醋酸 60ml，混匀，配好的试剂避光冷藏。（冰醋酸自备[注]）

3.标准品：10nmol/ml 四乙氧基丙烷，4℃冷藏。

[注]：冰醋酸又名乙酸，一般的医药公司、化剂公司均有售，要购 AR 级即分析纯级的乙酸的较好，乙酸含量为 99%以上。试剂盒冷藏至少可保存一年。

KGT003 （50assays）：

1. Buffer B 用时每瓶加 170ml 双蒸水混匀，4℃冷藏。

2.试剂 C（显色剂）：用时将粉剂加入到 90℃~100℃的热双蒸水 30ml 中，（在溶解过程中可适当加热），充分溶解后用双蒸水补足至 30ml 再加冰醋酸 30ml，混匀，配好的试剂避光冷藏。（冰醋酸自备[注]）

3.标准品：10nmol/ml 四乙氧基丙烷，4℃冷藏。

[注]：冰醋酸又名乙酸，一般的医药公司、化剂公司均有售，要购 AR 级即分析纯级的乙酸的较好，乙酸含量为 99%以上。试剂盒冷藏至少可保存一年。

四． 操作方法

1. 操作表：

	标准管	标准空白管	测定管	测定空白管**
10nmol/ml 标准品（ml）	a*			
无水乙醇（ml）		a*		
测试样品（ml）			a*	a*
Buffer A（ml）	a*	a*	a*	a*
混匀（摇动几下试管架）				
Buffer B（ml）	3	3	3	3
试剂 C（ml）	1	1	1	
50%冰醋酸（ml）				1

漩涡混合器混匀，试管口用保鲜薄膜扎紧，用针头刺一小孔，95℃水浴（或用锅开盖煮沸）40 分钟，取出后流水冷却， 532nm 处，1cm 光径，蒸馏水调零，测各管吸光度值。

a*表示所取的样品量、标准品量、无水乙醇的量、buffer A 的量，四者均相等。例如样品取 0.1 ml 则标准品、无水乙醇及 buffer A 也取 0.1ml，若样品取 0.2 ml 则标准品、无水乙醇及 buffer A 也取 0.2 ml。因吸光度与加样量呈正比曲线，因而结果不受影响。

**** 测定空白管每个样本都需要做。**

2. 参考取样量：血清（浆）取 0.1～0.2ml。低浓度脂蛋白悬液 0.1～0.2ml。细胞悬液及细胞上清取 0.1～0.2ml。

3. 规范操作方法标准管参考吸光度：当标准品取样量为 0.1ml 时，则标准管吸光度减去标准空白管的吸光度 0.065～0.070.当标准品取样量为 0.2ml 时，则标准管吸光度减去标准空白管的吸光度为 0.130～0.140.

4. 规范操作方法及简便操作方法中，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。

5. 计算公式：

（1）、血清（浆）中 MDA 含量计算公式：

$$\text{血清(浆)中}MDA\text{含量}=\frac{\text{测定管吸光度}-\text{测定空白管吸光度}}{\text{标准管吸光度}-\text{标准空白管吸光度}}\times\text{标准品浓度}(10nmol/ml)$$

（nmol/ml）

（2）、组织及细胞中 MDA 含量计算公式：

$$MDA\text{含量}=\frac{\text{测定管吸光度}-\text{测定空白管吸光度}}{\text{标准管吸光度}-\text{标准空白管吸光度}}\times\text{标准品浓度}(10nmol/ml)\div\text{蛋白含量}(mgprot/ml)$$

（nmol/mgprot）

*nmol/mgprot 为纳摩尔/毫克蛋白

6、计算举例：

（1）、取未稀释血清 0.1ml，检测 MDA 含量，测定管吸光度 0.037，测定空白管吸光度 0.019，标准管吸光度 0.078，标准空白管吸光度 0.007。计算如下：

$$\text{血清(浆)中}MDA\text{含量}=\frac{\text{测定管吸光度}-\text{测定空白管吸光度}}{\text{标准管吸光度}-\text{标准空白管吸光度}}\times\text{标准品浓度}\ (10nmol/ml)=0.037-0.019/0.078-0.007=2.535nmol/ml$$

（2）、取细胞培养上清 0.2ml，检测 MDA 含量，测定管吸光度 0.032，测定空白管吸光度 0.012，标准管吸光度 0.154，标准空白管吸光度 0.004。计算如下：

$$\text{细胞上清中}MDA\text{含量}=\frac{\text{测定管吸光度}-\text{测定空白管吸光度}}{\text{标准管吸光度}-\text{标准空白管吸光度}}\times\text{标准品浓度}\ (10nmol/ml)=0.032-0.012/0.154-0.004=1.33nmol/ml$$

（3）、取 10%腓肠肌匀浆上清 0.1ml，检测 MDA 含量，测试管吸光度 0.124，测定空白管吸光度 0.006，标准管吸光度 0.078，标准空白管吸光度 0.006。10%腓肠肌匀浆上清蛋白含量为 6.36mgprot / ml。计算如下：

$$\text{细胞匀浆中}MDA\text{含量}\ (nmol/ml)=\frac{\text{测定管吸光度}-\text{测定空白管吸光度}}{\text{标准管吸光度}-\text{标准空白管吸光度}}\times\text{标准品浓度}\ (10nmol/ml)\div\text{待测样本蛋白含量}$$

$$(mgprot/ml)=(0.124-0.006)/(0.078-0.006)*10nmol/ml\div6.36mgprot/ml=2.577nmol/mgprot$$

五． **简便操作方法：（如果样本数量很多，您可以采用简便操作方法。）**

1、混合试剂的配制：

将样本总数 n 放宽 4 只量分别乘以 1，2，3 号试剂，按计算量将 3 种试剂混合在一起。

测定管混合试剂总量＝[(n+$4^{注}$)×1 号试剂 a* ml]+[(n+4)×2 号试剂 3ml]+[(n+4) ×3 号试剂 1ml]

对照管混合试剂总量＝[(n+$4^{注}$)×1 号试剂 a* ml]+[(n+4)×2 号试剂 3ml]+[(n+4) ×50%冰醋酸 1ml]

注：按所需检测的样本数加上标准管及标准空白管的数，再放宽 2 只（避免吸到最后试剂量不够）。混合试剂需多少配东少。

2、简便操作表：

	标准管	标准空白管	测定管	测定空白管**
10nmol/ml 标准品（ml）	a*			
无水乙醇（ml）		a*		
测试样品（ml）			a*	a*
测定管混合试剂（ml）	4	4	4	
对照管混合试剂（ml）				4

漩涡混合器混匀，试管口用保鲜薄膜扎紧，用针头刺一小孔，95℃水浴（或用锅开盖煮沸）40 分钟，取出后流水冷却，532nm 处，1cm 光径，蒸馏水调零，测各管吸光度值。

a*表示所取的样品量、标准品量、无水乙醇的量、buffer A 的量，四者均相等。例如样品取 0.1 ml 则标准品、无水乙醇及 buffer A 也取 0.1ml，若样品取 0.2 ml 则标准品、无水乙醇及 buffer A 也取 0.2 ml。因吸光度与加样量呈正比曲线，因而结果不受影响。

**** 测定空白管每个样品都需要做**。

注 1：以上规范操作法及简便操作法适用于各种动植物的样本（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方法中，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。

3、计算公式：

（1）、血清（浆）中 MDA 含量计算公式：

$$\text{血清(浆)中}MDA\text{含量}=\frac{\text{测定管吸光度}-\text{测定空白管吸光度}}{\text{标准管吸光度}-\text{标准空白管吸光度}}\times\text{标准品浓度（}10nmol/ml\text{）}$$

（2）、组织及细胞中 MDA 含量计算公式：

$$MDA\text{含量}=\frac{\text{测定管吸光度}-\text{测定空白管吸光度}}{\text{标准管吸光度}-\text{标准空白管吸光度}}\times\text{标准品浓度（}10nmol/ml\text{）}\div\text{蛋白含量}(mgprot/ml)$$

（nmol/mgprot）

4、计算举例：

（1）、取某人未稀释血清 0.1ml，检测 MDA 含量，测定管吸光度 0.037，测定空白管吸光度 0.018，标准管吸光度 0.078，标准空白管吸光度 0.007。计算如下：

$$\text{血清（浆）中}MDA\text{含量}(nmol/ml)=\frac{\text{测定管吸光度}-\text{测定空白管吸光度}}{\text{标准管吸光度}-\text{标准空白管吸光度}}\times\text{标准品浓度（}10nmol/ml\text{）}\times\text{样品测试前稀释倍数}=$$

$$(0.037-0.018)/(0.078-0.007)\times10nmol/ml\times1=2.676nmol/ml$$

六. 注意点：

1. 试管要刷洗干净，尤其测微量样品时更为重要。

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^{0}C 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。这种情况可增加离心转速（3000 转/分以上）或者延长离心时间使沉淀完全。

5. 冬天若发现测试溶液呈雾状可以轻轻放入水浴箱稍稍加温，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，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、氯仿的量不变。

7. 95^{0}C 水浴时最好用带盖的试管，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 0.1 ml，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，保存期一年。试剂三配置后避光室温保存至少三个月（颜色变为咖啡色即不可使用）。

（7）、血清样品放置 4^{0}C，3~5 天内测试结果不变。—70^{0}C 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，只需恒温水浴箱或铝锅、铝盆开盖煮沸，及 721、722、751、752 分光光度计任一型号均可。

（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。