

# 丙二醛 (MDA) 检测试剂盒

(货号: BC021 比色法)

## 一、测定意义及原理

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 (Thibabitoric Acid TBA) 所以此法称 TBA 法。

## 二、试剂组成及配制 (96T)

试剂组成	规格	组份	保存条件
试剂一	20ml*1 瓶	液体	室温保存
天冷时会凝固, 每次测试前可 37°C 加热以加速溶解, 直至透明方可应用			
试剂二	12ml*1 瓶	液体	4°C 保存
用时每瓶加 340ml 蒸馏水混匀, 4°C 冷藏 (注意不要碰到皮肤上)			
试剂三	1 瓶	粉剂	4°C 避光保存
用时将粉剂加蒸馏水 60ml, 加热到 90°C ~ 100°C 充分溶解后用蒸馏水补足至 60ml, 再加冰醋酸 60ml, 混匀, 配好的试剂避光冷藏。			
试剂五	5ml*1 瓶	10nmol/ml 四乙氧基丙烷	4°C 保存
【注】: 冰醋酸 (分析纯, 乙酸浓度 ≥ 99.5%); 测试盒冷藏至少可保存一年。			

## 三、操作过程:

### 1、样本处理:

①血清(浆): 直接测定, 如超过线性范围用生理盐水稀释后测定。

②培养液样本: 吸取培养液, 1000 转/分钟, 离心 10 分钟, 取上清测定。

[注]: 一般建议细胞密度在 100 万个/mL 以上。

③组织样本: 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, 冰水浴条件下机械匀浆, 2500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液待测。



[注]:

1、如组织样本为非高脂样本，匀浆介质统一用磷酸盐缓冲液(0.1mol/L pH 7.4)或生理盐水进行提取。

2、如组织样本为高脂样本或部分为高脂样本，匀浆介质可统一用无水乙醇进行提取。

④细胞样本:

A、细胞收集: 将制备好的细胞悬液取出 1000 转/分, 离心 10 分钟, 弃上清液, 留细胞沉淀; 用等渗缓冲液 (推荐 0.1mol/L、PH7~7.4 磷酸盐缓冲液) 清洗 1~2 次, 同样 1000 转/分钟, 离心 10min, 弃上清液, 留细胞沉淀;

B、细胞破碎:加入 0.2~0.3mL 的匀浆介质(推荐 0.1mol/L、PH7~7.4 磷酸盐缓冲液或生理盐水) 进行匀浆, 冰水浴条件下超声破碎(功率:300W, 3~5 秒/次, 间隔 30 秒, 重复 3~5 次)或手动匀浆, 制备好的匀浆液不离心直接测定。也可采用裂解液裂解(推荐 TritonX-100, 1~2%, 裂解液 30~40 分钟), 裂解好的液体不离心直接测定。

[注]: 一般建议细胞密度在 100 万个/mL 以上。破碎好的液体可显微镜观察细胞是否破碎完全

2、操作表:

	空白管	标准管	测定管	对照管**
10nmol/ml 标准品 (ml)		a*		
无水乙醇 (ml)	a*			
测试样本 (ml)			a*	a*
试剂一 (ml)	a*	a*	a*	a*
混匀, 摇动几下离心管架				
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, 用针在盖上扎一小孔, 旋涡混匀器混匀, 95°C水浴 (或用锅开盖煮沸) 40 分钟, 取出后流水冷却, 然后 3500~4000 转/分, 离心 10 分钟, (3000 转/分以下离心时间需延长, 目的使沉淀完全)。取上清\*\*\*, 532nm 处, 1cm 光径, 蒸馏水调零, 测各管吸光度值。

【注】a\*表示所取的样品量、标准品量、无水乙醇的量、试剂一的量, 四者均相等。(a\*一般取 0.1-0.2ml)

例如样品取 0.1ml 则标准品、无水乙醇、试剂一也取 0.1ml, 若样品取 0.2ml 则标准品、无水乙醇及试剂一也取 0.2ml。因吸光度与加样量呈正比曲线, 故结果不受影响。

\*\* 一般情况下, 标准管、空白管及对照管每批只需做 1~2 只, 若样本不存在溶血、脂血现象, 则对照管可以不测, 用标准空白管来代替对照管。

\*\*\* 吸取上清比色时最好用移液器吸取上清加入比色皿中, 尽量避免倾倒, 以免沉淀进入比色皿, 影响吸光度。

2、参考取样量: 血清 (浆) 取 0.1~0.2ml。低密度脂蛋白悬液取 0.1~0.2ml。食油取 0.03ml。肝组织、心肌、肌肉组织、螺旋藻等, 取 5%或 10%匀浆 0.1~0.2ml 较好。

3、标准管参考吸光度当标准品取样量为 0.1ml 时, 则分光光度计测定标准管吸光度减去空白管的吸光度为 0.065~0.070 (酶标仪测定取 200μl 读数时为 0.045 左右)。当标准品取样量为 0.2ml 时, 则标准管吸光度减去空白管的吸光度为 0.130~0.140 (酶标仪测定取 200μl



读数时为 0.1 左右)。

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。

七、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：

工作液 I 的配制：试剂一：试剂二：试剂三= $a^*$ ：3：1，用多少配多少，配好后当天测定

工作液 II 的配制：试剂一：试剂二：50%冰醋酸= $a^*$ ：3：1，用多少配多少，配好后当天测定

【注】： $a^*$ 表示与样本的取样量相同，单位为毫升 (ml)

简便操作表：

	空白管	标准管	测定管	对照管**
10nmol/ml 标准品 (ml)		$a^*$		
无水乙醇 (ml)	$a^*$			
测试样本 (ml)			$a^*$	$a^*$
工作液 I (ml)	4ml	4ml	4ml	
工作液 II (ml)				4ml

离心管盖上盖，用针在盖上扎一小孔，旋涡混匀器混匀，95℃水浴（或用锅开盖煮沸）40 分钟，取出后流水冷却，然后 3500~4000 转/分，离心 10 分钟，(3000 转/分以下离心时间需延长，目的使沉淀完全)。取上清\*\*\*，532nm 处，1cm 光径，蒸馏水调零，测各管吸光度值。

【注 1】： $a^*$ 表示所取的样品量、标准品量、无水乙醇的量、试剂一的量，四者均相等。

例如样品取 0.1ml 则标准品、无水乙醇、试剂一也取 0.1ml，若样品取 0.2ml 则标准品、无水乙醇及试剂一也取 0.2ml。因吸光度与加样量呈正比曲线，因而结果不受影响。

\*\* 对照管可省略不做，用空白管来代替。

\*\*\* 吸取上清比色时最好用移液器吸取上清加入比色皿中，尽量避免倾倒，以免沉淀进入比色皿，影响吸光度。

【注 2】：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 3】：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。

八、注意点：

1、离心管要刷洗干净，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℃水浴前要充分混匀。3、天冷时试剂一会凝固，一定要水浴加热至透明方可应用。

4、水浴时间及温度要固定。没有水浴锅的可用铝锅、铝盒、铝盆等开盖煮沸即可。5、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。



- 6、比色时注意不要将沉淀倒入比色杯中，最好用移液器吸入比色皿。
- 7、冬天若发现测试溶液呈雾状可以轻轻放水浴箱稍加温，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。
- 8、若为高脂血清或油脂类物质，可加等量的无水乙醇处理后方可测定，具体操作方法见前。
- 9、样本取样量若您的样量较多，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。

洗涤红细胞时，离心后的上清要尽量吸取干净，以保证抽提液体积准确。

95℃水浴时最好用带盖的离心管，以免反应液的蒸发。若没有带盖的离心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。

九、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=1.5%，同一份标本数次测试结果相差极微。
- 5、呈色稳定，呈色后 24 小时内测吸光度不变。
- 6、试剂稳定，保存期一年以上。
- 7、血清样品放置 4℃，3~5 天内测试结果不变。-20℃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。另附样本前处理实验方法学。

