

微量丙二醛（MDA）测试盒

TBA 法：50 管/24 样

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。

二、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。

三、测试所需仪器设备：

可见光分光光度计，可调到 95℃左右的恒温水浴箱或沸水浴锅，离心机

四、试剂盒组成与配制：

试剂一：液体 10ml×1 瓶，4℃保存。

试剂二：液体 6ml×1 瓶，用时加 170ml 双蒸水混匀，4℃冷藏。（注意不要碰到皮肤上）。

试剂三：粉剂×1 支，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，配好的试剂避光室温保存。

（注：冰醋酸自备）

标准品：10nmol/ml 四乙氧基丙烷 5ml×1 瓶，4℃冷藏。

[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。

五、试剂盒组成与配制：

试剂一：液体 20ml×1 瓶，4℃保存。

试剂二：液体 12ml×1 瓶，用时每瓶加 340ml 双蒸水混匀，4℃冷藏（注意不要碰到皮肤上）。

试剂三：粉剂×1 支，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，配好的试剂避光室温保存。

（注：冰醋酸自备）

标准品：10nmol/ml 四乙氧基丙烷 5ml×1 瓶，4℃冷藏。

[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。

六、规范操作方法：

1、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*			

测试样品 (ml)			a*	a*
试剂一 (ml)	a*	a*	a*	a*
混匀 (摇动几下试管架)				
试剂二 (ml)	3	3	3	3
试剂三 (ml)	1	1	1	
50%冰醋酸 (ml)				1

旋涡混匀器混匀，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，双蒸水调零，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、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。

**对照管每个样本都需要做。

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。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空白管的吸光度为0.065~0.070。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。

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：

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)

2、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

漩涡混匀器混匀，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，双蒸水调零，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、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。

**对照管每个样本都需要做。

注 1: 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 2: 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、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℃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、氯仿的量则不变。
- 7、95℃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。

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=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（颜色变成咖啡色即不可使用）。

- 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。