

丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量试剂盒说明书

微量法 100管/96样

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

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MDA。通过检测MDA的水平即可检测脂质氧化的水平。

测定原理：

MDA与硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA)缩合，生成红色产物，在532nm有最大吸收峰，进行比色后可估测样品中过氧化脂质的含量；同时测定600nm下的吸光度，利用532nm与600nm下的吸光度的差值计算MDA的含量。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配置：

提取液：液体100mL×1瓶，4℃保存；

试剂一：液体30mL×1瓶，4℃保存；

注意事项：

临用前注意试剂一是否完全溶解，如未溶解，可以70℃-90℃加热，并振荡以促进溶解。

MDA提取：

1、细菌、细胞或组织样品的制备：

细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（10⁴个）：提取液体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细菌或细胞加入1mL提取液），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率20%或200W，超声3s，间隔10s，重复30次）；8000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

组织：按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL提取液），进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

2、血清（浆）样品：直接检测。

测定步骤：

1、吸取0.3mL 试剂一于1.5mL离心管中，再加入0.1mL样本，混匀。

2、95℃水浴中保温30min（盖紧，防止水分散失），置于冰浴中冷却，10000g，25℃，离心10min。

3、吸取200μL上清液于微量石英比色皿或96孔板中，测定532nm和600nm处的吸光度，记为A532和A600， $\Delta A = A532 - A600$ 。

MDA含量计算：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、血清（浆）中MDA含量的计算：

MDA含量(nmol/ mL)=[$\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] ÷ V样 = 25.8 × ΔA

2、细菌、细胞或动物组织中MDA含量计算

(1) 按照蛋白浓度计算

$$\text{MDA含量(nmol/ mg prot)}=[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) = 25.8 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

需要另外测定，建议使用本公司BCA蛋白质含量测定试剂盒。

(2) 按照样品质量计算

$$\text{MDA含量(nmol/g 鲜重)}=[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) = 25.8 \times \Delta A \div W$$

(3) 按照细菌或细胞密度计算：

$$\text{MDA含量(nmol/104)}=[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) = 0.0516 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积， 4×10^{-4} L； ϵ ：丙二醛摩尔消光系数， 155×10^3 L / mol /cm；d：比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.1 mL；V样总：加入提取液体积，1 mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细胞或细菌总数，500万。

b.用96孔板测定的计算公式如下

1、血清（浆）中MDA含量的计算：

$$\text{MDA含量(nmol/ mL)}=[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div V_{\text{样}} = 51.6 \times \Delta A$$

2、细菌、细胞或动物组织中MDA含量计算

(1) 按照蛋白浓度计算

$$\text{MDA含量(nmol/ mg prot)}=[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) = 51.6 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

需要另外测定，建议使用本公司BCA蛋白质含量测定试剂盒。

(2) 按照样品质量计算

$$\text{MDA含量(nmol/g 鲜重)}=[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) = 51.6 \times \Delta A \div W$$

(3) 按照细菌或细胞密度计算：

$$\text{MDA含量(nmol/104)}=[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) = 0.1032 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积， 4×10^{-4} L； ϵ ：丙二醛摩尔消光系数， 155×10^3 L / mol /cm；d：96孔板光径，0.5cm；V样：加入样本体积，0.1 mL；V样总：加入提取液体积，1 mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细胞或细菌总数，500万。