

丙二醛 (MDA) 试剂盒说明书

(货号: ADS-W-YH002-48 微板法 48 样)

有效期: 3个月

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、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配置:

提取液: 液体 50mL×1 瓶, 4°C保存;

试剂一: 液体 15mL×1 瓶, 4°C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°C-90°C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 (10^4 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°C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°C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°C水浴中保温 30min (盖紧, 防止水分散失), 置于冰浴中冷却, 10000g, 25°C, 离心 10min。

3、吸取 200 μ L 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：

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

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

$$\text{MDA 含量}(\text{nmol/ mg prot})=[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) = 25.8 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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

$$\text{MDA 含量}(\text{nmol/g 鲜重})=[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) = 25.8 \times \Delta A \div W$$

(3) 按照细菌或细胞密度计算：

$$\text{MDA 含量}(\text{nmol}/10^4)=[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) = 0.0516 \times \Delta A$$

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：

$$\text{MDA 含量}(\text{nmol/ mL})=[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} = 51.6 \times \Delta A$$

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

$$\text{MDA 含量}(\text{nmol/ mg prot})=[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) = 51.6 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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

$$\text{MDA 含量}(\text{nmol/g 鲜重})=[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) = 51.6 \times \Delta A \div W$$

(3) 按照细菌或细胞密度计算：

$$\text{MDA 含量}(\text{nmol}/10^4)=[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) = 0.1032 \times \Delta A$$

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。