

丙二醛 (MDA) 试剂盒说明书

(货号: ADS-F-YH002 分光法 48样)

有效期: 6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、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配置:

提取液: 液体 60mL×1 瓶, 4°C保存;

试剂一: 液体 30mL×1 瓶, 4°C保存;

试剂二: 粉剂×2瓶, 4°C保存;

MDA检测工作液的配制: 用时在每瓶试剂二中加入15mL试剂一, 溶解混匀, 4°C保存待用。

注意事项:

MDA检测工作液较难溶解, 可以70°C加热, 并剧烈振荡以促进溶解。或者通过超声处理以促进溶解。

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 0.6mL MDA检测工作液于 1.5mL 离心管中, 再加入 0.2mL 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、吸取上清液于 1mL 玻璃比色皿中, 测定 532nm 和 600nm 处的吸光度, 记为 A532 和 A600, $\Delta A = A532 - A600$ 。

MDA 含量计算:

1、血清(浆)中MDA含量的计算:

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

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

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

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

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

(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, 8×10^{-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, 0.2mL; V样总: 加入提取液体积, 1mL; 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。