

丙二醛(MDA)含量试剂盒说明书

(货号: ADS-W-YH002-196 微板法 196 样 有效期: 9 个月)

一、指标介绍:

丙二醛 (MDA) 是由于生物体官衰老或在逆境条件下受伤害, 其组织或器官膜脂质发生过氧化反应而产生的。它的含量与生物体衰老及逆境伤害有密切关系。MDA 在高温、酸性条件下, 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。

二、试剂盒组分与配制

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 110mL×1 瓶	4℃ 保存	1. 用前摇匀, 且用蒸馏水稀释一倍后再使用; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
工作液	液体 60mL×1 瓶	4℃ 避光保存	1. 若有沉淀析出, 50℃ 水浴至溶解。溶解后一个月内使用完毕可室温避光保存, 长期保存则需 4 度避光保存; 2. 保存期间若有沉淀析出可再次 50℃ 水浴至溶解待用。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。4℃×12000rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量(g):提取液体积(mL)为 1:5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 在 4℃ 或冰浴进行匀浆 (使用各类常见电动匀浆器或超声破碎)。4℃ 约 12,000rpm 离心 10min, 取上清作为待测样品。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量(10^4): 提取液(mL)为 500~1000:1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、检测步骤:

① 打开酶标仪预热 30min (等仪器过自检程序亦可), 同时水浴锅加热到 90-95℃。

② 在 EP 管中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管
工作液	300
样本	200
混匀后, 在 90-95℃ 水浴中保温 30min, 取出放冰上冷却,	

25°C, 12000rpm 离心 10min, 取 200μL 上清液至 96 孔板中, 分别于 532nm 和 600nm 处读取吸光度 A, $\Delta A = A_{532} - A_{600}$ 。

【注】：若是样本量极少的血清, 可减少加样体积 V1 (如由 200μL 减至 25μL, 并用生理盐水或蒸馏水补齐 200μL), 则改变后的加样量 V1 需重新代入公式计算。

五、结果计算:

1、按样本鲜重计算:

$$\text{MDA 含量(nmol/g 鲜重)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (W \times V_1 \div V) = 32.3 \times \Delta A \div W$$

2、按蛋白浓度计算:

$$\text{MDA 含量(nmol/mg Prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (Cpr \times V_1 \div V) = 32.3 \times \Delta A \div Cpr$$

3、液体 MDA 含量:

$$\text{MDA 含量(nmol/mL)} = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_1 = 32.3 \times \Delta A$$

4、按细胞数量计算:

$$\text{MDA 含量(nmol/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (500 \times V_1 \div V) = 0.065 \times \Delta A$$

V---样本提取液的总体积, 1 mL;

V1---加入反应体系样本体积, 0.2mL;

V2---样本加入量与工作液总反应液体积, 5×10^{-4} L; d---光径, 0.5cm;

ϵ ---MDA 摩尔消光系数, 155×10^3 L/mol/cm;

W---样本质量, g;

500---细胞数量, 万。

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。