

# 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 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℃ 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℃ 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 200 $\mu$ 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,  $4 \times 10^{-4}$  L;  $\epsilon$ : 丙二醛摩尔消光系数,  $155 \times 10^3$  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,  $4 \times 10^{-4}$  L;  $\epsilon$ : 丙二醛摩尔消光系数,  $155 \times 10^3$  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。