

## 丙二醛(MDA)检测试剂盒（微量法）

**注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。**

### 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。

### 试剂组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：液体 30mL×1 瓶，4℃ 保存；

### 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:

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

#### 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

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

##### (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,  $4 \times 10^{-4}$  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:

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

#### 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

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

##### (2) 按照样品质量计算

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

##### (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。

## 注意事项:

临用前注意试剂一是否完全溶解, 如未溶解, 可以  $70^{\circ}\text{C}$ - $90^{\circ}\text{C}$  加热, 并振荡以促进溶解。