

丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量试剂盒说明书

(微板法 96 样)

一、产品简介:

丙二醛(MDA)是由于生物体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

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 110mL×1 瓶	4℃保存	
工作液	液体 30mL×1 瓶	4℃避光保存	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(保存期间若有沉淀析出可再次 50℃水浴至溶解待用)。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、丙二醛(MDA)的测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

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、上机检测

① 打开酶标仪预热 30min,同时水浴锅加热到 90-95℃。

② 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
工作液	300
样本	200
混匀后,在 90-95℃水浴中保温 30min(管口用封口膜封紧或者用重物压实),取出放冰上冷却,25℃,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 200 μ L), 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:

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

3、液体 MDA 含量:

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

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。