



## 丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量试剂盒说明书

### 微量法

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。

#### 试剂的组成和配置：

产品名称	50T/48S	100T/96S	Storage
提取液：液体	50ml	100ml	RT, 避光
试剂一：液体	10ml	20ml	RT, 避光
试剂二：粉剂	1 瓶	1 瓶×2	4°C, 避光
说明书	一份		

工作液配制：临用前取 1 瓶试剂二加入 10mL 试剂一，溶解混匀，4°C 保存一周。工作液较难溶解，可以 70°C-90°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。

#### 自备仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水

#### 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°C-90°C 加热，并振荡以促进溶解。

#### MDA 提取：

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。

血清（浆）样品：按照血清（浆）：提取液体积（ml）为 1：1 的比例，充分混合。8000g 4°C 离心 10min，取上清，置冰上待测。

### 测定步骤：

- 1、吸取 0.2ml 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 200μl 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：

$$\text{MDA 含量 (nmol/ml)} = 2 \times [\Delta A \div (\epsilon \times d)] \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} = 25.8 \times \Delta A$$

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

$$\text{MDA 含量 (nmol/mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d)] \times (V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}}) \div \text{Cpr} = 12.9 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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

$$\text{MDA 含量 (nmol/g 鲜重)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d)] \times (V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}}) \times V_{\text{样总}} \div W = 12.9 \times \Delta A \div W$$

(3) 按照细菌或细胞密度计算：

$$\text{MDA 含量 (nmol/10}^4\text{)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d)] \times (V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}}) \div (500 \div V_{\text{样总}}) = 0.0258 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积，0.4 ml； $\epsilon$ ：丙二醛摩尔消光系数， $155 \times 10^{-3} \text{ L} / \mu\text{mol} / \text{cm}$ ；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.2 ml；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。

#### 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：

$$\text{MDA 含量 (nmol/ml)} = 2 \times [\Delta A \div (\epsilon \times d)] \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} = 51.6 \times \Delta A$$

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

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

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

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

(3) 按照细菌或细胞密度计算：



MDA 含量( $\text{nmol}/10^4$ )= $[\Delta A \div (\epsilon \times d)] \times (V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}}) \div (500 \div V_{\text{样总}}) = 0.0516 \times \Delta A$

V 反总: 反应体系总体积, 0.4 ml;  $\epsilon$ : 丙二醛摩尔消光系数,  $155 \times 10^{-3} \text{ L} / \mu\text{mol} / \text{cm}$ ; d: 比色皿光径, 0.5cm; V 样: 加入样本体积, 0.2 ml; 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。