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℃-90℃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 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，ΔA= 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:

MDA 含量(nmol/ mL)=[ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷V 样=25.8×ΔA

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

MDA 含量(nmol/ mg prot)=[ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷(Cpr×V 样)=25.8× ΔA ÷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

MDA 含量(nmol/g 鲜重)=[ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷(W ×V 样÷V 样总)=25.8×ΔA ÷W

（3）按照细菌或细胞密度计算:

MDA 含量(nmol/10^4)=[ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷(500×V 样÷V 样总)=0.0516×ΔA

V 反总：反应体系总体积， 4×10^{-4} L；ε：丙二醛摩尔消光系数， 155×10^3 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:

MDA 含量(nmol/ mL)=[ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷V 样=51.6×ΔA

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

MDA 含量(nmol/ mg prot)=[ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷(Cpr×V 样)=51.6×ΔA÷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

MDA 含量(nmol/g 鲜重)=[ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷(W ×V 样÷V 样总)=51.6×ΔA÷W

（3）按照细菌或细胞密度计算:

MDA 含量(nmol/10^4)=[ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷(500×V 样÷V 样总)=0.1032×ΔA

V 反总： 反应体系总体积， 4×10^{-4} L；ε：丙二醛摩尔消光系数， 155×10^3 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。