

## 丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

**注 意：**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、微量石英比色皿/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 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。