



细胞丙二醛（MDA）测定试剂盒说明书(精简版)

（货号:A003-4-1 微板法 400T）

免责声明：测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验,否则由此导致的后果用户自行承担!

一、试剂盒组成与配制（试剂盒有效期 1 年）:

	试剂组成	规格	保存条件
试剂一	澄清剂	25mL×1 瓶	室温
试剂一天冷时会凝固，每次测试前适当水浴加温以加速溶解，直至透明方可应用			
试剂二	贮备液	12mL×1 瓶	4℃冷藏
试剂二应用液的配制：用时每瓶加双蒸水 340mL 混匀，4℃冷藏。（注意不要碰到皮肤上）			
试剂三	显色剂	60mL×2 瓶	4℃避光冷藏
工作液配制：试剂一：试剂二：试剂三=0.2：3：1 的比例进行配制，现用现配，用多少配多少			
试剂四	10nmol/mL 标准品	1mL×1 瓶	4℃密封冷藏
试剂五	提取液	250mL×1 瓶	4℃密封冷藏

二、所需仪器耗材及试剂:

含 530nm 酶标仪及 96 孔板（附送一块）、95℃水浴锅、台式低速离心机、各种规格移液器、双蒸水、无水乙醇、生理盐水（0.9%）或 PBS（0.1M）、涡旋混匀器、离心管、蛋白测定试剂（本公司有售）。

二、操作步骤:

1、**样本前处理：**弃去细胞培养上清，用细胞刮将细胞刮下，用移液器将细胞转移到塑料离心管中，加试剂五提取液 0.2~0.5mL，混匀 2 分钟，再将细胞破碎（可用玻璃匀浆器手动匀浆或者超声破碎）制成悬液，取样 0.1mL 于 1.5mL 离心管中（预先用酒精灯加热针头在管盖上刺一小孔）。

2、**操作表：**（可用塑料离心管进行操作）

	空白管	标准管	测定管
无水乙醇(mL)	0.1		
10nmol/mL 标准品(mL)		0.1	
测试样品(mL)			0.1
工作液(mL)	1	1	1
离心挂盖上盖(在盖上用针扎一小孔)，旋涡混匀器混匀，95℃以上水浴 40 分钟，取出后流水冷却，4000 转/分钟离心 10 分钟，530nm，将酶标板空板进行扫描，准确吸取各管上清液 0.25mL 加入到 96 孔板中，酶标仪测定各孔吸光度（计算时要减去空板读数）。			

三、计算公式:

$$\text{MDA 含量} \left(\frac{\text{nmol}}{\text{mgprot}} \right) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$$

$C_{\text{标准}}$ ：标准品浓度，10nmol/mL；

C_{pr} ：样本蛋白浓度，mgprot/mL(prot 指蛋白)。样本蛋白浓度可用

BCA 法或考马斯亮蓝法测定，两种方法试剂本所有售（A045-2 和 A045-3/-4）。

四、计算举例:

按上述操作步骤操作，测得空白管吸光度 0.002，标准管吸光度 0.266，测定管吸光度 0.094，蛋白浓度为 0.144mgprot/mL，则计算如下：

$$\begin{aligned} \text{MDA 含量} \left(\frac{\text{nmol}}{\text{mgprot}} \right) &= \frac{0.094 - 0.002}{0.266 - 0.002} \times 10 \div 0.144 \\ &= 24.2 \text{ nmol / mgprot} \end{aligned}$$

五、测试原理

过氧化脂质降解产物中的丙二醛（MDA）可与硫代巴比妥酸(TBA)缩合，形成红色产物,在 532nm 处有最大吸收峰。因底物为硫代巴比妥酸（Thiobarbituric Acid TBA）所以此法称 TBA 法。

六、测定意义:

机体通过酶系统与非酶系统产生氧自由基，后者能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸（polyunsaturated fatty acid, PUFA），引发脂质过氧化作用，并因此形成脂质过氧化物。如：醛基（丙二醛 MDA）、酮基、羟基、羰基、氢过氧基或内过氧基，以及新的氧自由基等。脂质过氧化作用不仅把活性氧转化成活性化学剂，即非自由基性的脂类分解产物，而且通过链式或链式支链反应，放大活性氧的作用。因此，初始的一个活性氧能导致很多脂类分解产物的形成，这些分解产物中，一些是无害的，另一些则能引起细胞代谢及功能障碍，甚至死亡。氧自由基不但通过生物膜中多不饱和脂肪酸（PUFA）的过氧化引起细胞损伤，而且还能通过脂氢过氧化物的分解产物引起细胞损伤。因而测试 MDA 的量常常可反映机体内脂质过氧化的程度，间接地反映出细胞损伤的程度。

MDA 的测定常常与 SOD、XOD、NO、T-AOC、MAO、POD、脂褐质、FFA、LPS、总酯酶、TG、TC、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白的测定相互配合，SOD 活力的高低间接反应了机体清除氧自由基的能力，而 MDA 的高低又间接反应了机体细胞受自由基攻击的严重程度，通过 SOD 与 MDA 的结果分析有助于医学、生物学、药理及工农业生产的发展。