

丙二醛（MDA）测试盒说明书（精简版）

（货号:A003-1 TBA 法）

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!

本试剂盒是在国内外众多测试方法的基础上改进的一种微量、快速、简便、准确、对操作人员健康无损害的测试方法。通过测试可反映出血清（浆）、乳汁等细胞外液、红细胞、白细胞、培养细胞以及各种动植物的细胞水平及亚细胞水平的脂质过氧化物的量。

一、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。

二、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。

三、测试所需仪器和试剂：

含532nm波长的分光光度计及1cm光径比色皿（或酶标仪及96孔板）、95℃水浴锅、电炉（配试剂加热用）、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）、冰醋酸（分析纯，乙酸浓度≥99.5%）、涡旋混匀器、离心管、蛋白测定试剂（组织及细胞样本用，本公司有售）。

四、试剂盒组成与配制:(试剂盒有效期1年)

试剂	50管/48样(A003-1-1)	100管/96样(A003-1-2)	保存条件
试剂一	液体10mL×1瓶	液体20mL×1瓶	4℃或室温
试剂二	液体6mL×1瓶 用时每瓶加170mL蒸馏水混匀	液体12mL×1瓶 用时每瓶加340mL蒸馏水混匀	4℃冷藏
试剂三	粉剂×1支 用时将粉剂加蒸馏水30mL，加热到90℃~100℃充分溶解后用蒸馏水补足至30mL，再加冰醋酸30mL	粉剂×1支 用时将粉剂加蒸馏水60mL，加热到90℃~100℃充分溶解后用蒸馏水补足至60mL，再加冰醋酸60mL	4℃冷藏
标准品	10nmol/mL四乙氧基丙烷5mL×1瓶	10nmol/mL四乙氧基丙烷5mL×1瓶	4℃冷藏

注：试剂一天冷时会凝固，每次测试前可37℃加热以加速溶解，直至透明方可应用。

五、操作步骤：

1、操作表：（操作前请仔细阅读第2项“参考取样量”）

	空白管	标准管	测定管	对照管**
10nmol/mL标准品(mL)		0.1		
无水乙醇（mL）	0.1			
测试样品（mL）			0.1	0.1
试剂一（mL）	0.1	0.1	0.1	0.1

混匀（摇动几下离心管架）				
试剂二（mL）	3	3	3	3
试剂三（mL）	1	1	1	
50%冰醋酸（mL）				1

离心管盖上盖，用针在盖上扎一小孔，涡旋混匀器混匀，95℃水浴（或用锅开盖煮沸）40分钟，取出后流水冷却，然后3500~4000转/分，离心10分钟，（3000转/分以下离心时间需延长，目的使沉淀完全。另外如有大量脂质存在,可加入0.1mL氯仿,涡旋抽提约60秒后再离心）。取上清**，532nm处，1cm光径，蒸馏水调零，测各管吸光度值。

* 一般情况下，标准管、空白管每批只需做1~2只，若样本没有特殊颜色、浊度等现象，则对照管可以不测，用空白管来代替对照管。

**吸取上清比色时不要吸到底部沉淀，用酶标仪读数时只需吸取200-300μL上清加入到96孔板中，532nm处读数。

- 2、参考取样浓度（量）：除水生动物类的样本需要提前摸索取样浓度外，其它动物的血清一般直接取样0.1mL测定（甚至样本量足够时可取0.2mL或0.3mL），组织匀浆一般取10%的浓度测定（肝脏样本稍高些，可直接取0.1mL，其它组织在量足够时可取0.2mL或0.3mL），细胞匀浆或细胞培养液可取样0.3-0.5mL测定（细胞建议数量在10⁶以上）。（取样量加大时空白管无水乙醇、标准管标准品量、试剂一量也要相应加大，其它试剂量不变）
- 3、标准管参考吸光度：当标准品取样量为0.1mL时，则分光光度计测定标准管吸光度减去空白管的吸光度为0.065~0.070（酶标仪测定取200μL读数时为0.04左右）。当标准品取样量为0.2mL时，则标准管吸光度减去空白管的吸光度为0.130~0.140（酶标仪测定取200μL读数时为0.08左右）。
- 4、规范操作方法及简便操作方法中，若发现检测样本吸光度太低，可以将水浴时间40分钟延长至80分钟，但您的同一课题中MDA的检测都必须延长至80分钟，以免造成批间差异。
- 5、计算公式：

(1)、血清（浆）中MDA含量计算公式：

$$\text{血清（浆）中MDA含量 (nmol/mL)} = \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \text{标准品浓度 (10nmol/mL)} \times \text{样本测试前稀释倍数}$$

(2)、组织中MDA含量计算公式：

$$\text{组织中MDA含量 (nmol/mgprot)} = \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \text{标准品浓度 (10nmol/mL)} \div \text{组织匀浆蛋白浓度 (mgprot/mL)}$$

[注]：* nmol/mgprot为纳摩尔/毫克蛋白

六、简便操作方法：（如果样本数量很多，您可以采用简便操作方法。）

1、混合试剂的配制：

工作液Ⅰ的配制：试剂一：试剂二：试剂三=0.1：3：1，现配现用；
工作液Ⅱ的配制：试剂一：试剂二：50%冰醋酸=0.1：3：1，现配现用。

2、简便操作表：

	空白管	标准管	测定管	对照管**
10nmol/mL标准品（mL）		0.1		
无水乙醇（mL）	0.1			
测试样品（mL）			0.1	0.1
工作液Ⅰ（mL）	4	4	4	
工作液Ⅱ（mL）				4

离心管盖上盖，用针在盖上扎一小孔，涡旋混匀器混匀，95℃水浴（或用锅开盖煮沸）40分钟，取出后流水冷却，然后3500~4000转/分，离心10分钟，（3000转/分以下离心时间需延长，目的使沉淀完全）。取上清**，532nm处，1cm光径，蒸馏水调零，测各管吸光度值。

* 样本无特殊颜色、浊度等因素时，对照管可省略不做,用空白管来代替。

**吸取上清比色时不要吸到底部沉淀，用酶标仪读数时只需吸

取 200-300μL 上清加入到 96 孔板中，532nm 处读数。

[注 1]: 样本加入量可根据含量高低来调整，具体见第 5 页“参
考取样浓度（量）”。

[注 2]: 以上规范操作法及简便操作法适用于人及各种动植物的样
本（包括血清、动植物组织及体液、细胞及细胞培养液等）。

[注 3]: 规范操作法及简便操作法中，若发现检测样本吸光
度太低，可以将水浴时间 40 分钟延长至 80 分钟，但您
的同一课题中 MDA 的检测都必须延长至 80 分钟，以免
造成批间差异。

3、计算公式：

(1)、血清（浆）中 MDA 含量计算公式：

血清（浆）中 MDA 含量 (nmol/mL) = $\frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(10\text{nmol/mL})} \times \frac{\text{样本测试前}}{\text{稀释倍数}}$

(2)、组织中 MDA 含量计算公式：

组织中 MDA 含量 (nmol/mgprot) = $\frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(10\text{nmol/mL})} \div \frac{\text{组织匀浆蛋白浓度}}{(\text{mgprot/mL})}$

七、对于 MDA 含量很低或样本量少的样本可用微量操作方法，
例如小鼠血清（浆）、小儿血清（浆）、小鼠肺组织、皮肤组织、
肾组织、视网膜、细胞及细胞培养液等可用以下方法进行测定：

(一)、样本前处理见实验方法学中的组织匀浆处理，可制成
10%或 5%的匀浆，但要注意，因样本量很少，所以做
好的组织匀浆最好不要离心，例如培养的细胞等破碎后
可以不离心。取样时注意要摇匀后立即取样。

(二)、试剂组成与配制：

1、(100 管)微量操作法中的试剂三配制如下：

- ①、按规范操作方法来配制 MDA 3 号试剂：将 1 支 MDA 3
号粉剂倒入烧杯内加 90℃~100℃的热蒸馏水 64mL*，
充分溶解（溶解过程中可适当加热），随后再加入 60mL
冰醋酸混匀即可配成。
- ②、再将上述配好的 MDA 3 号试剂用 50%冰醋酸**按 2:1 进
行稀释，用多少配多少。例如您需要用微量法测 MDA 需
要试剂三为 15mL，则可以取上述按规范操作法配好的试
剂三 10mL 加 50%冰醋酸 5mL，混匀即可。配好的试剂避
光 4℃冰箱冷藏（冰醋酸自备）。

[注]：* 因蒸馏水热胀冷缩，加热过程要蒸发，本应加
60mL，现多加 4mL，冷却后在 60mL。

** 50%冰醋酸的配制是 50mL 蒸馏水加 50mL 冰醋
酸混合而成的。

2、(50 管)微量操作法中的试剂三配制如下：

- ①、按规范操作方法来配制 MDA 3 号试剂：将 1 支 MDA 3
号粉剂倒入烧杯内加 90℃~100℃的热蒸馏水 32mL*，
充分溶解（溶解过程中可适当加热）。随后再加入 30mL
冰醋酸混匀即可配成。
- ②、再将上述配好 MDA 3 号试剂用 50%冰醋酸按 2:1 进行稀
释，用多少配多少。例如您需要用微量法测 MDA 需要试
剂三为 15mL，则可以取上述按规范操作法配好的试剂三
10mL 加 50%冰醋酸 5mL，混匀即可。配好的试剂避光 4℃
冰箱冷藏（冰醋酸自备***）。

[注]：* 因蒸馏水热胀冷缩，加热过程要蒸发，本应加
30mL，现多加 2mL，冷却后在 30mL。

** 50%冰醋酸的配制是 50mL 蒸馏水加 50mL 冰醋
酸混合而成的。

(三)、操作步骤：

	空白管	标准管	测定管	对照管**
10n mol/mL 标准品(mL)		0.1		
无水乙醇 (mL)	0.1			
测试样品 (mL)			0.1	0.1
试剂一 (mL)	0.1	0.1	0.1	0.1
混匀（摇动几下离心管架）				
试剂二 (mL)	1.5	1.5	1.5	1.5
试剂三 (mL)	1.5	1.5	1.5	
50%冰醋酸 (mL)				1.5

离心管盖上盖，用针在盖上扎一小孔，涡旋混匀器混匀，95℃
水浴（或用锅开盖煮沸）40 分钟，取出后流水冷却，然后 3500~

4000 转/分，离心 10 分钟，（3000 转/分以下离心时间需延长，目
的使沉淀完全）。取上清***，532nm 处，1cm 光径，蒸馏水调零，
测各管吸光度值。

[注]：（含量较低的样本）在样本量足够时，可增加取样量至
0.2mL（同时无水乙醇、标准品、试剂一量均加 0.2mL，
其它试剂量不变）。

** 一般情况下，标准管、空白管每批只需做 1~2 只，若样
本没有特殊颜色、浊度等现象，则对照管可以不测，用空
白管来代替对照管。

*** 吸取上清比色时不要吸到底部沉淀，用酶标仪读数时只
需吸取 200-300μL 上清加入到 96 孔板中，532nm 处读数。

注①：用此方法所测各管吸光度值比规范操作方法要高，
但不影响最终结果。

注②：若发测定管吸光度太低，可将水浴时间 40 分钟延长
至 80 分钟，但您的同一课题中 MDA 的检测都必须
延长至 80 分钟，以免造成批间差异。

注③：此方法标准管参考吸光度：当标准品取样量为 0.1mL
时，则标准管吸光度减去空白管吸光度为 0.103~
0.112。当标准品取样量为 0.2mL 时，则标准管吸光
度减去空白管吸光度为 0.206~0.224。

(四)、计算公式及举例：

1、计算公式：

(1)、血清（浆）中 MDA 含量计算公式：

血清（浆）中 MDA 含量 (nmol/mL) = $\frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(10\text{nmol/mL})} \times \frac{\text{样本测试前}}{\text{稀释倍数}}$

(2)、组织中 MDA 含量计算公式：

组织中 MDA 含量 (nmol/mgprot) = $\frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(10\text{nmol/mL})} \div \frac{\text{组织匀浆蛋白浓度}}{(\text{mgprot/mL})}$

* nmol/mgprot 为纳摩尔/毫克蛋白

八、高脂血症样本或者需要测定油脂中的 MDA，例如豆油或色
拉油、菜油中的 MDA 量，可以用下面的方法测定。

1、操作方法：

	空白管	标准管	测定管
10nmol/mL 标准品 (mL)		0.1	
无水乙醇(mL)	0.1		
油脂类样品或高脂血清(浆)(mL)			0.1
试剂一(mL)	0.1	0.1	0.1
混匀（摇动几下离心管架）			
试剂二 (mL)	3.0	3.0	3.0
试剂三 (mL)	1.0	1.0	1.0
离心管盖上盖，用针在盖上扎一小孔，涡旋混匀器混匀，95℃水 浴（或用锅开盖煮沸）80 分钟，取出后流水冷却			
氯仿 (mL)	0.1	0.1	0.1

涡旋震荡 1-3 分钟，然后 3500~4000 转/分，离心 10 分钟，
取上清***，532nm 处，1cm 光径，蒸馏水调零，测各管吸
光度值。

* 一般情况下，标准管、空白管每批只需做 1~2 只。

** 油脂类样本一般要用无水乙醇稀释 2-3 倍后取样测定。某些
高脂血清(浆)需要用生理盐水稀释 2 倍后测定。

*** 吸取上清比色时不要吸到底部沉淀和氯仿，用酶标仪读数
时只需吸取 200-300μL 上清加入到 96 孔板中，532nm 处读
数。

2、标准管参考吸光度：当标准品取样量为 0.1mL 时，则分
光光度计测定标准管吸光度减去空白管的吸光度为
0.065~0.070（酶标仪测定取 200μL 读数时为 0.045 左右）。
当标准品取样量为 0.2mL 时，则标准管吸光度减去空白管
的吸光度为 0.130~0.140（酶标仪测定取 200μL 读数时为
0.1 左右）。

3、计算公式及举例：

(1)、计算公式：

高脂血、油中 MDA 含量 (nmol/mL) = $\frac{\text{测定OD值} - \text{空白OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(10\text{nmol/mL})} \times \frac{\text{样本测试前}}{\text{稀释倍数}}$

九、红细胞中的 MDA 检测方法

(一)、微量红细胞中的 MDA 检测方法 (样本量少时用)

1、样本前处理：(可用以下二种方法中的一种)

(1)、载玻片取全血，进行 MDA 测定：

如果您所需测的血样很少又很珍贵，例如新生儿指血，或小老鼠的尾血，可采用载玻片上滴加 1~2 滴肝素涂匀，60℃ 以下烤干，或自然吹干。将以上采取的少量血样滴在有肝素的载玻片上，用微量加样器取您所需的血量，再制备成 1：99 的溶血液。(即全血：蒸馏水=1：99)

(2)、玻璃微量采血管采集红细胞及溶血液的制备：

①、用 20μL 的玻璃微量采血管取载玻片上的肝素抗凝全血 20μL 左右。将玻璃毛细血管置水平位，迅速取下吸球，将空隙长的一端放在酒精灯火焰的三分之一处烧至透红，管端变成圆球状闭结为止。用尺测量并记录血柱长度 a 厘米。用纸将采血管卷好，然后将采血管封闭端朝下装入离心管中，1500 转/分离心 5~10 分钟，取出后用小砂轮在血清与红细胞分界处划开掰断 (或用剪刀直接剪断)。将有红细胞的开口端倒放入装有 1mL 蒸馏水的离心管中，再以 1500 转/分离心 5 分钟，此时毛细管中的红细胞沉淀于离心管底部，用镊子从离心管中取出毛细管丢弃后，将离心管放在混匀器上涡旋混匀制成溶血液。

②、

血液稀释倍数的计算：稀释倍数 = 双蒸水体积 ÷ $\left(\frac{\text{血球柱长度}a}{\text{采血管}20\mu\text{L} \text{容积长度}} \times 20\mu\text{L} \right)$

2、MDA 检测操作步骤：

①、方法一：(规范操作方法)

	空白管	标准管	测定管	对照管**
10n mol/mL 标准品		0.1		
无水乙醇 (mL)	0.1			
1:x 血球溶血液 (mL)			0.1	0.1
试剂一 (mL)	0.1	0.1	0.1	0.1
混匀 (摇动几下离心管架)				
试剂二 (mL)	3	3	3	3
试剂三 (mL)	1	1	1	
50%冰醋酸 (mL)				1

离心管盖上盖，用针在盖上扎一小孔，涡旋混匀器混匀，95℃ 水浴 (或用锅开盖煮沸) 40 分钟，取出后流水冷却，然后 3500~4000 转/分，离心 10 分钟，(3000 转/分以下离心时间需延长，目的使沉淀完全)。取上清***，532nm 处，1cm 光径，蒸馏水调零，测各管吸光度值。

* 一般情况下，标准管、空白管每批只需做 1~2 只，若样本没有特殊颜色、浊度等因素，则对照管可以不测，用空白管来代替对照管。

** 吸取上清比色时不要吸到底部沉淀，用酶标仪读数时只需吸取 200-300μL 上清加入到 96 孔板中，532nm 处读数。

规范操作方法标准管吸光度：当标准品取样量为 0.1mL 时，则分光光度计测定标准管吸光度减去空白管的吸光度为 0.065~0.070 (酶标仪测定 200μL 读数时为 0.045 左右)。当标准品取样量为 0.2mL 时，则标准管吸光度减去空白管的吸光度为 0.130~0.140 (酶标仪测定 200μL 读数时为 0.1 左右)。

注：若发现检测样本吸光度太低，可以将水浴时间 40 分钟延长至 80 分钟，但您的同一课题中 MDA 的检测都必须延长至 80 分钟，以免造成批间差异。

②、方法二：(微量法) (用此方法所测各管吸光度值比规范操作方法所得值要高，但不影响最终结果。)

先将已经按规范操作方法配好的 MDA 三号试剂用 50% 的冰醋酸按 2：1 稀释，例如将配好的 MDA3 号试剂 100mL，加 50% 的冰醋酸 50mL，混匀。也可以用多少配多少进行以下检测。

(注：50%冰醋酸的配制是 50mL 蒸馏水加 50mL 冰醋酸混合而成的。)

	空白管	标准管	测定管	对照管**
10n mol/mL 标准品(mL)		0.1		
无水乙醇 (mL)	0.1			
测试样品 (mL)			0.1	0.1

试剂一 (mL)	0.1	0.1	0.1	0.1
混匀 (摇动几下离心管架)				
试剂二 (mL)	1.5	1.5	1.5	1.5
试剂三 (mL)	1.5	1.5	1.5	
50%冰醋酸 (mL)				1.5

离心管盖上盖，用针在盖上扎一小孔，涡旋混匀器混匀，95℃ 水浴 (或用锅开盖煮沸) 40 分钟，取出后流水冷却，然后 3500~4000 转/分，离心 10 分钟。取上清**，532nm 处，1cm 光径，蒸馏水调零，测各管吸光度值。

* 一般情况下，标准管、空白管每批只需做 1~2 只，若样本没有特殊颜色、浊度，则对照管可以不测，用空白管来代替对照管。

** 吸取上清比色时不要吸到底部沉淀，用酶标仪读数时只需吸取 200-300μL 上清加入到 96 孔板中，532nm 处读数。

注：若发现检测样本吸光度太低，可以将水浴时间 40 分钟延长至 80 分钟，但您的同一课题中 MDA 的检测都必须延长至 80 分钟，以免造成批间差异。

此方法标准管参考吸光度：当标准品取样量为 0.1mL 时，分光光度计测定标准管吸光度减去空白管的吸光度为 0.103~0.112。当标准品取样量为 0.2mL 时，分光光度计测定标准管吸光度减去空白管的吸光度为 0.206~0.224。

3、取某浓度的溶血液进行血红蛋白测定：

Hb 测定：取 100 倍浓缩的 Hb 测试液 1mL (本所有货供应)，加水至 100mL 配成应用测试液，取 1：x 血球溶血液 20μL 加稀释好的 Hb 应用测试液 5mL，充分混匀，静置 5 分钟，波长 540nm，1cm 光径，蒸馏水调零，比色，记录各管吸光度值。Hb 计算：将吸光度值乘以 367.7 即为 Hb 克数/升。如果血样量特少时，则样本量和试剂量均可减少一半或按比例减少。

4、红细胞中 MDA 的计算及举例：

①、计算公式：

红细胞中 MDA 含量 $\left(\frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(10\text{nmol/mL})} \div \text{溶血液} \right)$
* nmol/mgHb 为纳摩尔/毫克血红蛋白

(二)、全血中红细胞 MDA 检测方法 (样本量多时用)

1、样本前处理：

①、血球制备：取肝素抗凝全血 0.15mL，加 2~3mL 的生理盐水，2500~3000 转/分离心 5~10 分钟 (小鼠红细胞容易破裂，最好用 1000~1500 转/分离心 5~10 分钟)，弃上清留沉淀的红细胞。上清一定要尽量吸净丢弃，以免影响结果。

②、溶血液的制备：取离心后沉淀的红细胞加所取全血体积 4 倍的蒸馏水 (0.6mL)，在涡旋混匀器上混匀 1 分钟使细胞充分溶解。

③、抽提：在上述溶血液中加入全血体积 2 倍的无水乙醇 (0.3mL)，(也可用 95%乙醇代替)在涡旋混匀器上充分混匀 30 秒钟。

④、沉淀蛋白：再加全血体积 2 倍的氯仿 (0.3mL) 置涡旋混匀器上混匀 1 分钟，然后 3000~3500 转/分，离心 5~10 分钟。此时液体分为三层，上层为 MDA 抽提液，中层为血红蛋白沉淀物，下层为三氯甲烷。取上清并记录体积，约 0.9mL。

2、操作步骤：

①、1nmol/mL 标准应用液的配制：将 10nmol/mL 的标准品 10 倍稀释，即取 10nmol/mL 的标准品 1mL 加 9mL 的无水乙醇配成 1nmol/mL 的标准应用液。

②、检测操作：(若发现检测样本吸光度太低，可以将水浴时间 40 分钟延长至 80 分钟，但您的同一课题中 MDA 的检测都必须延长至 80 分钟，以免造成批间差异。)

	空白管	标准管	测定管
1 nmol/mL 标准品 (mL)		0.8	
无水乙醇 (mL)	0.8		
抽提液 (mL)			0.8
试剂二 (mL)	1.0	1.0	1.0
试剂三 (mL)	1.0	1.0	1.0

离心管盖上盖，用针在盖上扎一小孔，涡旋混匀器混匀，95℃ 水浴 (或用锅开盖煮沸) 40 分钟，取出后流水冷却，于 532nm

处, 1cm 光径, 蒸馏水调零, 测各管吸光度值。

3、全血中红细胞 MDA 计算及举例:

①、计算公式:

$$\text{全血中MDA含量 (nmol/mL)} = \frac{\text{测定OD值} - \text{空白OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度 (nmol/mL)}}{\text{取样量 (0.15mL)}}$$

十、参考值:

1:99 的人的红细胞溶血液 $6.38 \pm 0.072 \text{ nmol/mL}$,

人血清 (浆) $4.06 \pm 0.6 \text{ nmol/mL}$,

10%大鼠脑匀浆 $4.72 \pm 1.44 \text{ nmol/mgprot}$,

10%大鼠肾匀浆 $2.70 \pm 0.46 \text{ nmol/mgprot}$,

10%大鼠肺匀浆 $1.65 \pm 0.44 \text{ nmol/mgprot}$,

10%大鼠心肌匀浆 $1.63 \pm 0.36 \text{ nmol/mgprot}$

小鼠血清 (浆) $5.30 \pm 0.73 \text{ nmol/mL}$ 。

10%小鼠脑匀浆 $16.3 \pm 5.04 \text{ nmol/mgprot}$,

5%小鼠心肌匀浆 $14.64 \pm 2.68 \text{ nmol/mgprot}$,

10%小鼠肌肉匀浆 $51.59 \pm 11.08 \text{ nmol/mgprot}$,

10%小鼠肝匀浆 $8.26 \pm 2.75 \text{ nmol/mgprot}$ 。

十一、注意点:

- 1、离心管要洁净, 尤其测微量样品时更为重要。
- 2、配制试剂时要充分混匀。测试过程中第一管吸的试剂要丢弃, 加样品或试剂时要垂直加, 不要加在管壁上。95℃水浴前要充分混匀。
- 3、天冷时试剂一会凝固, 一定要水浴加热至透明方可应用。
- 4、水浴时间及温度要固定。没有水浴锅的可用铝锅、铝盒、铝盆等开盖煮沸即可。
- 5、离心沉淀一定要充分, 否则影响吸光度, 造成结果不稳定。这种情况可增加离心转速 (3000 转/分以上) 或者延长离心时间使沉淀完全。
- 6、比色时注意不要将沉淀倒入比色杯中, 最好用移液器吸入比色皿。
- 7、冬天若发现测试溶液呈雾状可以轻轻放水浴箱稍稍加温, 待溶液溶解呈透明状态用移液器吸取放入比色杯中, 若仍然呈雾状, 则考虑为高脂血症。
- 8、样本取样量: 若您的样量较多, 取样量可以加倍, 无水乙醇、标准品、试剂一均要加倍, 其它试剂量不变。若您的样本为贫血病人的血样, 则取样量也要加倍, 无水乙醇、标准品、试剂一的量也要加倍, 其它试剂量不变。
- 9、洗涤红细胞时, 离心后的上清要尽量吸取干净, 以保证抽提液体积准确。
- 10、95℃水浴时最好用带盖的离心管, 以免反应液的蒸发。若没有带盖的离心管可用冰箱保鲜膜盖好, 用橡皮筋扎好后在保鲜膜上用针刺一小孔即可代替盖子。

十二、本试剂盒优点:

- 1、本试剂盒中试剂均无刺激性气味, 对操作人员无任何毒害。
- 2、快速准确, 操作简便, 每小时可测 100 例以上样本。
- 3、灵敏度高, 血清或血浆样品只需 0.1mL, 或者更少。
- 4、再现性好, 变异系数 CV=1.5%, 同一份标本数次测试结果相差极微。
- 5、呈色稳定, 呈色后 24 小时内测吸光度不变。
- 6、试剂稳定, 保存期一年以上。
- 7、血清样品放置 4℃, 3~5 天内测试结果不变。 -20℃ 以下可保存 3 个月至半年。
- 8、测试面广, 可测血清 (浆)、各种组织匀浆, 培养细胞等。
- 9、主要原料均为进口, 但价格适中。
- 10、不需昂贵与特殊仪器, 只需恒温水浴箱或者铝锅、铝盆开盖煮沸, 及 721、722、751、752 分光光度计任一型号均可。
- 11、不受气温等外界因素的影响。是目前国内最稳定的 MDA 测试方法。