

# 细胞丙二醛 (MDA) 测定试剂盒

(货号: BC129 微板法 400T)

## 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°C 冷藏
试剂二应用液的配制: 用时每瓶加双蒸水 340mL 混匀, 4°C 冷藏。 (注意不要碰到皮肤上)			
试剂三	显色剂	60mL×2 瓶	4°C 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°C 密封冷藏
试剂五	提取液	250mL×1 瓶	4°C 密封冷藏

## 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:** (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°C 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:

地址: 武汉市东湖新技术开发区高科园二路盛齐安生物产业园 4 号楼

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

或

$$\text{MDA含量} \left( \frac{\text{nmol}}{10^6 \text{细胞}} \right) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \frac{\text{细胞数}}{V_{\text{样总}}}$$

**C<sub>标准</sub>**: 标准品浓度, 10nmol/mL;

**C<sub>pr</sub>**: 细胞匀浆蛋白浓度, mgprot/mL(prot 指蛋白)。可用 BCA 法或考马斯亮蓝法测定, 两种方法试剂本公式均有售 (A045-2 和 A045-3/-4) ;

**细胞数**: 细胞收集好后提前总数量, 10<sup>6</sup>个;

**V<sub>样总</sub>**: 细胞匀浆时加入的试剂五的总体积, mL。

#### 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:

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

#### 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 (Thibabitoric 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。