

丙二醛 (MDA) 测试盒

(货号:BC021-2 TBA 法)

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、测定原理

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:

可见光分光光度计或酶标仪,可调到 95℃ 左右的恒温水浴箱或沸水锅,离心机,涡旋混匀器,10mL 离心管、蒸馏水、无水乙醇(少量)、冰醋酸(分析纯,浓度 ≥ 99.5%)、50% 冰醋酸(可由冰醋酸 1:1 加蒸馏水稀释得来)、氯仿、蒸馏水、生理盐水等。

四、样本前处理:

血清(浆)、心肌灌流液、肾透析液、细胞培养液等液体样本:直接检测(某些水生动物血清 MDA 含量较高需要做预试(测定 OD 值小于 0.4)后测定);

动物组织样本:准确称取动物组织重量,按重量(g):体积(mL)=1:9 的比例加入 9 倍体积的匀浆介质(推荐生理盐水或 0.01mol/L 的 PBS),冰水浴条件下,机械匀浆,制备成 10% 的匀浆液,3500 转/分钟,离心 10 分钟,取上清液待测(部分水生动物或虾蟹肝胰腺 MDA 含量会比较高,需做预试后(测定 OD 值小于 0.4)再批量实验)(该匀浆上清需测定其蛋白浓度,蛋白测定试剂盒本公司有售)

植物组织样本:准确称取植物组织重量按重量(g):体积(mL)=1:4 的比例,加入 4 倍体积的匀浆介质(推荐 0.01mol/L PH7.0 ~ 7.4 磷酸盐缓冲液),冰水浴条件下,机械匀浆,制备成 20% 的匀浆液,3500 ~ 4000 转/分钟,离心 10 分钟,取上清液待测(有

些药材或植物粉末可用同样的方法进行处理);

细胞样本: 收集细胞后, 每份细胞 (细胞数量尽量不要低于 106 个, 越多越好) 加入 0.2-0.3mL 的生理盐水 (或者 0.01mol/L 的 PBS), 冰水浴下超声破碎 (功率 200-300W, 运行 5 秒, 间隔 15 秒, 反复 2-5min), 不离心直接吸取测定 (匀浆液需测定其蛋白浓度 (蛋白测定试剂盒本公司有售) 或是细胞在破碎前进行计数)。

红细胞样本: 处理及操作方法见本说明书第十点;

注: 组织样本若是高脂或油性样本而且只测 MDA 时, 匀浆介质可用无水乙醇代替 (但匀浆时要注意密封, 防止乙醇挥发导致的结果不准确), 此时匀浆液无需再测蛋白, 计算时用组织鲜重计算公式。

五、试剂盒组成与配制:(试剂盒有效期 1 年)

试剂	50 管/48 样	100 管/96 样	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	液体 12mL×1 瓶	4℃
	用时每瓶加 170mL 蒸馏水混匀或按比例 (6:170) 配制, 4℃保存 3~6 个月	用时每瓶加 340mL 蒸馏水混匀或按比例 (6:170) 配制, 4℃保存 3~6 个月	4℃
试剂三	粉剂×1 支	粉剂×1 支	4℃
	用时将粉剂加蒸馏水 30mL, 加热到 90℃~100℃溶解, 稍微冷却后再加冰醋酸 30mL 混合, 4℃保存 3~6 个月	用时将粉剂加蒸馏水 60mL, 加热到 90℃~100℃溶解, 稍微冷却后再加冰醋酸 60mL 混合, 4℃保存 3~6 个月	4℃避光
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℃

注: 试剂三配制时若是选用烧杯等敞口容器, 可多加水 2~4mL 以供加热蒸发损耗; 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。

六、操作步骤:

1、规范操作表:

	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
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	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, 95℃水浴 40 分钟, 取出冷水冷却, 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, 涡旋混匀约 60 秒后再离心), 取上清, 532nm 处, 1cm 光径, 蒸馏水调零, 分光光度计测各管 OD 值 (或是每管吸取上清 200μL 加到 96 孔板中, 酶标仪 532nm 处读数)。				

注: ①一般情况下, 标准管、空白管每批只需做 1~2 管, 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计算。

②吸取上清比色时不要吸到底部沉淀, 若离心后仍有固体物残留于上清中, 可加大离心转速或加入 0.1mL 氯仿, 涡旋 60 秒后再次离心再吸上清。

③用酶标仪读数时只需吸取 200μL 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按操作表直接取样 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 OD: 按操作表操作时光光度计测定标准管 OD 减去空白管的 OD 为 0.065 ~ 0.070 (酶标仪测定取 200 μ L 读数时为 0.04 左右, 当标准品取样量增加时该值会随之增加)。

4、若发现检测样本 OD 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:

$$\text{血清 (浆) 中 MDA 含量 (nmol/mL)} = \frac{\text{测定 OD 值} - \text{对照 OD 值}}{\text{标准 OD 值} - \text{空白 OD 值}} \times (10 \text{ nmol/mL}) \times \frac{\text{样本测试前}}{\text{稀释倍数}} \quad \text{(2)、组织中 MDA}$$

含量按蛋白浓度计算公式:

$$\text{组织中 MDA 含量 (nmol/mg 蛋白)} = \frac{\text{测定 OD 值} - \text{对照 OD 值}}{\text{标准 OD 值} - \text{空白 OD 值}} \times (10 \text{ nmol/mL}) \div \frac{\text{组织匀浆蛋白浓度}}{\text{(mg 蛋白/mL)}} \quad \text{(3)、组织中 MDA}$$

含量按样本鲜重计算公式:

$$\text{组织中 MDA 含量 (nmol/g 组织)} = \frac{\text{测定 OD 值} - \text{对照 OD 值}}{\text{标准 OD 值} - \text{空白 OD 值}} \times (10 \text{ nmol/mL}) \div \frac{\text{组织重量 (g)}}{\text{匀浆液总体积 (mL)}} \quad \text{(4)、细胞中 MDA}$$

含量计算公式:

$$\text{细胞中 MDA 含量 (nmol/10}^4 \text{ 细胞)} = \frac{\text{测定 OD 值} - \text{对照 OD 值}}{\text{标准 OD 值} - \text{空白 OD 值}} \times (10 \text{ nmol/mL}) \div \frac{\text{细胞总数 (10}^4 \text{ 个)}}{\text{匀浆液总体积 (mL)}}$$

6、计算举例:

例 1: 取某释血清 0.1mL, 测 MDA 含量, 测定管 OD0.036, 标准管 OD0.076, 标准空白管 OD0.006, 对照管用标准空白管来代替。计算结果如下:

$$\text{血清 (浆) 中 MDA 含量 (nmol/mL)} = \frac{0.036 - 0.006}{0.076 - 0.006} \times 10 \times 1 = 4.29 \text{ nmol/mL}$$

例 2: 取 0.1mL 蛋黄, 加入 0.9mL 无水乙醇, 充分混匀抽提 3 分钟, 4000 转/分离心 10 分钟取上清 0.2mL 检测 MDA 含量, 测定管 OD0.198, 标准管 OD0.151, 标准空白管 OD0.009, 对照管用标准空白管来代替。计算结果如下:

$$\text{蛋黄中 MDA 含量 (nmol/mL)} = \frac{0.198 - 0.009}{0.151 - 0.009} \times 10 \times 10 = 133.098 \text{ nmol/mL}$$

例 3: 取 10% 的大鼠肝组织匀浆 0.1mL, 检测 MDA 含量, 测定管 OD0.214, 标准管 OD0.079, 标准空白管 OD0.009, 对照管用标准空白管来代替。10% 的大鼠肝匀浆的蛋白浓度 8.5mgprot/mL, 计算结果如下:

$$\text{大鼠肝中 MDA 含量 (nmol/mgprot)} = \frac{0.214 - 0.009}{0.079 - 0.009} \times 10 \div 8.5 = 3.45 \text{ nmol/mgprot}$$

例 4: 取 10% 的鲤鱼脑组织匀浆 0.1mL, 检测 MDA 含量, 测定管 OD0.314, 标准管 OD0.076, 标准空白管 OD0.006, 对照管用标准空白管来代替。10% 的鲤鱼脑组织匀浆的蛋白浓度 5.0788mgprot/mL, 计算如下:

$$\text{鲤鱼脑中 MDA 含量 (nmol/mgprot)} = \frac{0.314 - 0.006}{0.076 - 0.006} \times 10 \div 5.0788 = 8.663 \text{ nmol/mgprot}$$

例 5: 取 20% 的蚯蚓组织匀浆 0.1mL, 检测 MDA 含量, 测定管 OD0.082, 标准管 OD0.074, 标准空白管 OD0.005, 对照管 OD0.025。20% 的蚯蚓组织匀浆的蛋白浓度 10.3145mgprot/mL, 计算如下:

$$\text{蚯蚓中 MDA 含量 (nmol/mgprot)} = \frac{0.082 - 0.025}{0.074 - 0.005} \times 10 \div 10.3145 = 0.8009 \text{ nmol/mgprot}$$

例 6: 取 10% 的水稻叶片匀浆 0.2mL, 检测 MDA 含量, 测定管 OD0.077, 标准管 OD0.140, 标准空白管 OD0.003, 对照管用标准空白管来代替。10% 的水稻叶片匀浆的蛋白浓度 3.2729mgprot/mL, 计算结果如下:

$$\text{水稻叶片中 MDA 含量 (nmol/mgprot)} = \frac{0.077 - 0.003}{0.140 - 0.003} \times 10 \div 3.2729 = 1.6504 \text{ nmol/mgprot}$$

附录 I: 简便操作方法

(如果样本数量很多, 可采取此法, 更方便)

1、混合试剂的配制:

工作液 I 的配制比例: 试剂一: 试剂二: 试剂三=0.1: 3: 1, 现配现用;

工作液 II 的配制比例: 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, 95℃水浴 40 分钟, 取出冷水冷却, 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 OD 值 (或是每管吸取上清 200μL 加到 96 孔板中, 酶标仪 532nm 处读数)。

★注意点参照第 5 页规范操作。 ★计算公式与规范操作相同。

附录 II: 微量操作方法

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含量较低的一类样本可用以下方法进行检测。

(一)、做好的组织匀浆最好不要离心, 取样时注意要摇匀后立即取样。

(二)、试剂配制:

1、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试剂三溶液: 将 1 支 100 管/96 样规格的 MDA 3 号粉剂用蒸馏水 64mL (50 管/48 样规格的 3 号粉剂则加 32mL 蒸馏水) 加热溶解, 随后再加入 60mL (50 管/48 样规格的加 30mL) 冰醋酸混匀即可配成。

②、再将上述配好的试剂三溶液用 50%冰醋酸 (50%冰醋酸的配制是 50mL 蒸馏水加 50mL 冰醋酸混合而成的) 按 2:1 进行稀释, 用多少配多少。配好的试剂避光 4℃冰箱冷藏 (冰醋酸自备)。

[注]: 因蒸馏水在加热过程会蒸发, 本应加 60mL 或 30mL, 现多加 4mL 或 2mL 以备蒸发损耗。

(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)				
试剂二应用液 (mL)	1.5	1.5	1.5	1.5
试剂三溶液 (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, 95℃水浴 40 分钟, 取出冷水冷却, 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 OD 值 (或是每管吸取上清 200μL 加到 96 孔板中, 酶标仪 532nm 处读数)。

注: ① (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)。

②: 用此方法所测各管 OD 值比规范操作方法要高, 但不影响最终结果。

③: 若发现测定管 OD 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。

④: 此方法标准管参考 OD: 当标准品取样量为 0.1mL 时, 则标准管 OD 减去空白管 OD 为 0.103~0.112, 当标准品取样量增加时该值会随之增加)。

(四)、计算公式及举例:

1、计算公式参照第 7 页规范操作。

2、计算举例：

例 1: 取某人未稀释血清 0.1mL, 检测 MDA 含量, 测定管 OD0.030, 标准管 OD0.104, 标准空白管 OD0.009, 对照管用标准空白管来代替。计算如下:

$$\text{人血清中MDA含量 (nmol/mL)} = \frac{0.030 - 0.009}{0.104 - 0.009} \times 10 \times 1 = 2.21\text{nmol/mL}$$

例 2: 取 5%的大鼠肺组织匀浆 0.1mL, 检测 MDA 含量, 测定管 OD0.062, 标准管 OD0.104, 标准空白管 OD0.009, 对照管用标准空白管来代替。5%的大鼠肺组织匀浆蛋白浓度 2.45mg/mL, 计算如下:

$$\text{大鼠肺中MDA含量 (nmol/mgprot)} = \frac{0.062 - 0.009}{0.104 - 0.009} \times 10 \div 2.45 = 2.28\text{nmol/mgprot}$$

附录 III: 高脂或油脂中 MDA 的测定

(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
试剂二应用液 (mL)	3.0	3.0	3.0
试剂三溶液 (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, 95°C水浴 (或用锅开锅盖煮沸) 80 分钟, 取出后冷水冷却			
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 OD 值 (或是每管吸取上清 200μL 加到 96 孔板中, 酶标仪 532nm 处读数)。			

注: ①一般情况下, 标准管、空白管每批只需做 1~2 只。

② 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。

③ 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 200μL 上清加入到 96 孔板中, 532nm 处读数。

2. 标准管参考 OD:分光光度计测定标准管 OD 减去空白管的 OD 为 0.065 ~ 0.070 (酶标仪测定取 200μL 读数时为 0.045 左右, 当标准品取样量增加时该值会随之增加)。

3、计算公式及举例:

(1)、计算公式:

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

(2)、计算举例:

取高脂血症家兔血清按操作表进行 MDA 检测。测得标准管 OD 为 0.126, 测定管 OD 为 0.119, 空白管 OD 为 0.010, 对照管用标准空白管来代替。则计算如下:

$$\text{高脂家兔中MDA含量 (nmol/mL)} = \frac{0.119 - 0.010}{0.126 - 0.010} \times 10 \times 1 = 9.40\text{nmol/mL}$$

附录 IV: 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, 或小鼠的尾血, 可采用载玻片上滴加 1~2 滴肝素涂匀, 60°C 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。将玻璃毛细采血管置水平位, 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、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）				
试剂二应用液 (mL)	3	3	3	3
试剂三溶液 (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，95℃水浴 40 分钟，取出冷水冷却，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 OD 值（或是每管吸取上清 200μL 加到 96 孔板中，酶标仪 532nm 处读数）。				

注 1：一般情况下，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。

注 2：吸取上清比色时不要吸到底部沉淀，若离心后仍有固体物残留于上清中，可加大离心转速或加入 0.1mL 氯仿，涡旋 60 秒后再次离心再吸上清。

注 3：用酶标仪读数时只需吸取 200μL 上清加入到 96 孔板中，532nm 处读数。

规范操作方法标准管 OD：按操作表操作，分光光度计测定标准管 OD 减去空白管的 OD 为 0.065~0.070（酶标仪测定 200μL 读数时为 0.045 左右，当标准品取样量增加时该值会随之增加）。

注 4：若发现检测样本 OD 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 OD 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 MDA 3 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，95℃水浴 40 分钟，取出冷水冷却，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 OD 值（或是每管吸取上清 200μL 加到 96 孔板中，酶标仪 532nm 处读数）。				

注 1：一般情况下，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。

注 2：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 3：若发现检测样本 OD 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 OD：当标准品取样量为 0.1mL 时，分光光度计测定标准管 OD 减去空白管的 OD 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 OD 减去空白管的 OD 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 (相关试剂本公司有售)，加水至 100mL 配成应用测试液，取 1:x 血球溶血液 20 μ L 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 OD 值。**Hb 计算：**将 OD 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：

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

②、计算举例：

例 1：取某人 1:99 血球溶血液 0.1mL 按方法一进行 MDA 测定，测定管 OD 为 0.064，标准管 OD 为 0.077，标准空白管 OD 为 0.009，对照管 OD 为 0.011，对照管也可用标准空白管 OD 为 0.009 代替，1:99 血球溶血液中 Hb 含量为 11.08gHb/L，即 11.08mgHb/mL。则计算结果为：

$$\text{溶血液中MDA含量 (nmol/mgHb)} = \frac{0.064 - 0.011}{0.077 - 0.009} \times 10 \div 11.08 = 0.703\text{nmol/mgHb}$$

例 2：取某人 1:99 血球溶血液 0.1mL 按方法二微量法进行 MDA 测定，测定管 OD 为 0.084，标准管 OD 为 0.100，标准空白管 OD 为 0.015，对照管 OD 为 0.017，对照管也可用标准空白管 OD 为 0.015 代替，1:99 血球溶血液中 Hb 含量为 11.08gHb/L，即 11.08mgHb/mL。则计算结果为：

$$\text{溶血液中MDA含量 (nmol/mgHb)} = \frac{0.084 - 0.017}{0.100 - 0.015} \times 10 \div 11.08 = 0.711\text{nmol/mgHb}$$

附录 V：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 OD 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，95°C 水浴 40 分钟，取出冷水冷却，于 532nm 处，1cm 光径，蒸馏水调零，测各管 OD 值 A (或是每管吸取上清 200 μ L 加到 96 孔板中，酶标仪 532nm 处读数)。			

3、全血中红细胞 MDA 计算及举例：

①、计算公式：

$$\text{全血中MDA含量 (nmol/mL)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times \frac{\text{标准品浓度 (1nmol/mL)}}{\text{前处理上清总体积 (1.05mL)}} \times \text{取全血量 (0.15mL)}$$

②、计算举例:

例 1: 取某人的全血 0.15m, 用生理盐水洗涤, 离心, 弃上清, 在沉淀的红细胞中加 0.6mL 蒸馏水, 混匀 1 分钟, 加 0.3mL 无水乙醇, 混匀 30 秒, 再加 0.3mL 氯仿, 混匀 1 分钟, 3500 转/分离心 8 分钟, 取上层抽提液 0.8mL 检测, 得到标准管 OD 为 0.112, 测定管 OD 为 0.038, 空白管 OD 为 0.012, 则结果为:

$$\text{全血中MDA含量 (nmol/mL)} = \frac{0.038 - 0.012}{0.112 - 0.012} \times 1 \times 1.05 \div 0.15 = 1.82\text{nmol/mL}$$

附录 VI: 参考值

1:99 的人的红细胞溶血液 6.38±0.072nmol/mL,

人血清 (浆) 4.06±0.6nmol/mprot,

10%大鼠肾匀浆 2.70±0.46nmol/mgprot,

10%大鼠肺匀浆 1.65±0.44nmol/mgpl,

10%大鼠脑匀浆 4.72±1.44nmol/mgrot,

10%大鼠心肌匀浆 1.63±0.36nmol/mgprot

小鼠血清 (浆) 5.30±0.73nmol/mL。

10%小鼠脑匀浆 16.3±5.04nmol/mgprot,

5%小鼠心肌匀浆 14.64±2.68nmol/mgprot,

10%小鼠肌肉匀浆 51.59±11.08nmol/mgprot,

10%小鼠肝匀浆 8.26±2.75 nmol/mgprot。

(以上结果仅供参考, 各实验室可建立自己的参考值; 不同物种检样本差异较大, 正式实验前请尽量先做预试)

附录 VII: 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°C水浴前要充分混匀。
- 3、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。
- 4、离心沉淀一定要充分, 否则影响 OD, 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。
- 5、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。
- 6、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。
- 7、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。
- 8、95°C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。

附录 VIII: 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 OD 不变。
- 6、试剂稳定, 保存期一年以上。
- 7、血清样品放置 4°C, 3~5 天内测试结果不变。-20°C 以下可保存 3 个月至半年。



ELK Biotechnology

Tel: +86-027-59760950 Website: www.elkbiotech.cn

- 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。