

细胞丙二醛（MDA）测定试剂盒/微板法

微板法 400T

一、试剂盒组成与配制（400T）：

400T	试剂组成	规格	保存条件
试剂一	澄清剂	25ml×1 瓶	室温保存 1 年
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 1 年
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 1 年
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 1 年
试剂五	提取液	250ml×1 瓶	4℃密封冷藏 1 年

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 0.5ml，混匀 2 分钟，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）。

	空白管	标准管	测定管
无水乙醇(μl)	100		
10nmol/ml 标准品(μl)		100	
测试样品(μl)			1000
工作液(μl)	1000	1000	1000

盖上册，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 0.25ml 各管反应液加入到新的 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、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。

四、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、羧基、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。