

细胞丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量

< 编号: ml300805 微量法 100 管/96 样 >

注 意: 正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

氧自由基作用于脂质的不饱和脂肪酸, 生成过氧化脂质; 后者逐渐分解为一系列复杂的化合物, 其中包括 MDA。通过检测 MDA 的水平即可检测脂质氧化的水平。

测定原理:

MDA 与硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA)缩合, 生成红色产物, 在 532nm 有最大吸收峰, 进行比色后可估测样品中过氧化脂质的含量; 同时测定 600nm 下的吸光度, 利用 532nm 与 600nm 下的吸光度的差值计算 MDA 的含量。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配置:

裂解液: 液体 25mL×1 瓶, 4°C 保存;

试剂一: 液体 30mL×1 瓶^①, 4°C 保存;

临用前注意试剂一是否完全溶解, 如未溶解, 可以 40-60°C 加热, 并振荡以促进溶解

MDA 提取:

1、细菌、细胞或组织样品的制备:

培养细胞: 先收集细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细胞数量 1×10^6 个加入裂解液体积 0.2mL, 混匀后放置在冰盒上裂解 10min; 8000g 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

测定步骤:

1、在 1.5mL EP 管中依次加入:

试剂名称(μL)	测定管
试剂一	300
样本	100
混匀, 95°C水浴中保温 30min (盖紧, 防止水分散失), 置于冰浴中冷却, 10000g, 25°C, 离心 10min	

2、吸取 200 μL 上清液于微量石英比色皿或 96 孔板中, 测定 532nm 和 600nm 处的吸光度, 记为 A532 和 A600, $\Delta A = A532 - A600$

用 96 孔板测定的计算公式如下

1、细胞中 MDA 含量计算

(1) 按照蛋白浓度计算

$$\text{MDA 含量}(\text{nmol}/\text{mg prot})=[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \\ = 51.6 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

需要另外测定，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

(3) 按照细胞密度计算：

$$\text{MDA 含量}(\text{nmol}/10^4)=[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \\ = 0.1032 \times \Delta A$$

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 4×10^{-4} L; ϵ : 丙二醛摩尔消光系数, 155×10^3 L / mol / cm;
 d : 96 孔板光径, 0.5cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.1 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入裂解液体积,
0.2 mL; Cpr : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量, g; 500: 细胞总数, 100
万。

预实验的意义：

比色法检测试剂盒预实验非常重要

1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；

2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；

3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；

4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；

5、通过 3 - 5 组预实验，判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。