



丙二醛 (MDA)含量检测实验报告

一、实验器材及试剂

1、实验器材

名称	厂家	型号
立式冷藏柜	海尔	SC-332
电子天平	幸运	FA2204
S10 手持式高速匀浆机	上海菲桐仪器有限公司	S202404047
台式高速冷冻离心机	湖南恒诺仪器设备有限公司	2-16R
干式恒温器	申花	SH-G100
实验室超纯水机	砾鼎	MT-VF-20
涡旋混匀仪	JOANLAB	VM-500S
复合转子离心机	申花	SH-Mini7KS
酶标仪	赛默飞世尔仪器有限公司	Multiskan FC

2、主要实验耗材

耗材	品牌	货号
1.5mL 离心管	科兔生物	KTL-15-P
5ml 离心管	科兔生物	KTL-50-P
50ml 尖底离心管	科兔生物	KTL-500-P
200μL 吸头	科兔生物	KTX-H200-W
1000μL 吸头	科兔生物	KTX-H1000-W
1250μL 吸头	科兔生物	KTX-H1200-W
单道移液枪 2-20μL	科兔生物	KTY-20
单道移液枪 5-50μL	科兔生物	KTY-50
单道移液枪 10-100μL	科兔生物	KTY-100
单道移液枪 20-200μL	科兔生物	KTY-200
单道移液枪 100-1000μL	科兔生物	KTY-1000



二、实验步骤

试剂盒：丙二醛（MDA）定量检测试剂盒

货号：m1603552

1. 样本处理：

用预冷的 PBS (0.01 M, pH=7.4) 冲洗组织，去除残留血液，称重后将组织剪碎。将剪碎的组织与对应体积的 PBS (一般按 1:9 的重量体积比，比如 1g 的组织样品对应 9 mL 的 PBS，具体体积可根据实验需要适当调整，并做好记录。推荐在 PBS 中加入蛋白酶抑制剂) 加入玻璃匀浆器中，在冰上充分研磨。为了进一步裂解组织细胞，可以对匀浆液进行超声破碎或反复冻融。最后将匀浆液 $5000\times g$ 离心 5-10 分钟，取上清检测。

2. 试剂准备

(1) 使用前，所有的组分都要至少复温 60min，确保充分复温到室温。

(2) 浓缩洗涤液：从冰箱取出的浓缩洗涤液，会有结晶产生，这属于正常现象，水浴加热使结晶完全溶解。浓缩洗涤液与蒸馏水，按 1:20 稀释，即 1 份的浓缩洗涤液，添加 19 份的蒸馏水。

(3) 底物：底物液 A 和 B，在使用前，按 1:1 体积充分混合，混合后 15 分钟内使用。

3. 实验流程

(1) 按前面描述的方法，配制好试剂盒各种组分的工作液。

(2) 从铝箔袋中取出所需板条，剩余的板条用自封袋密封放回冰箱。

(3) 设置标准品孔、空白孔和样本孔，标准品孔各加不同浓度的标准品 $50\ \mu\text{L}$ ，空白孔不加，样本孔加待测样本 $50\ \mu\text{L}$ 。

(4) 除空白孔外，标准品孔和样本孔，加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的检测抗原 $100\ \mu\text{L}$ 。

(5) 用封板膜盖住反应板， 37°C 水浴锅或恒温箱温育 60min。

(6) 揭开封板膜，弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液，静置 20S，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复 5 次。若使用自动洗板机，请按洗板机操作程序进行洗板，添加浸泡 30s 的程序，可以提高检测的精度。洗板结束，加底物前，要在干净不掉屑的纸上，充分拍干反应板。

(7) 将底物 A 和 B 按 1:1 体积充分混合，所有孔中加入底物混合液 $100\ \mu\text{L}$ 。用封板膜盖住反应板， 37°C 水浴锅或恒温箱温育 15min。

(8) 所有孔加入终止液 $50\ \mu\text{L}$ ，在酶标仪上读取各孔吸光度 (OD 值)。

4. 结果计算



(1) 以标准品浓度做为横坐标，对应的吸光度（OD 值）作为纵坐标，利用计算机软件，采用四参数 Logistic 曲线拟合（4-pl），创建标准曲线方程，通过样本的吸光度（OD 值），利用方程计算样品的浓度值。

(2) 如果样品被稀释，通过上述方法测的浓度值，要乘以稀释倍数，才是样品的最终浓度。

5. 结果交付

计算对应样本的 MDA 含量，结果由 EXCEL 形式发送。