



## 丙二醛（MDA）含量检测试剂盒说明书

微量法

**注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。**

货号：BC0025

规格：100T/96S

**产品内容：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。**

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 42 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×2 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 12 mL×1 瓶	2-8℃保存

溶液的配制：

MDA 检测工作液的配制：临用前取 1 瓶试剂二加入 20mL 试剂一，溶解混匀，2-8℃保存一个月。MDA 检测工作液较难溶解，可以 70℃加热，并剧烈振荡以促进溶解，或者通过超声处理以促进溶解。

**产品说明：**

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，其中包括丙二醛（MDA）。通过检测 MDA 的水平即可检测脂质氧化的水平。

丙二醛（MDA）在酸性和高温条件下，可以与硫代巴比妥酸（thiobarbituric acid, TBA）缩合，生成棕红色的三甲川（3,5,5-三甲基恶唑-2,4-二酮），其最大吸收波长在 532nm。进行比色后可估测样本中 MDA 的含量。

**注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

**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、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

**操作步骤：**

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

- 1、细菌或细胞样本的制备：收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
- 2、组织样本的制备：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆；8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
- 3、低、中脂血血清（浆）等液体样本：直接检测。
- 4、高脂血或者油脂类样本：取 40μL 样本和 80μL 无水乙醇混合（即样本被稀释 3 倍），涡旋震荡 5min 后使用。不同高脂肪类样本可能会有不同的稀释倍数，可以稀释不同倍数进行预实验以确定最佳稀释倍数。同时操作表中空白管的蒸馏水应以（33μL 蒸馏水+67μL 乙醇）代替。

## 二、测定步骤

- 1、可见分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，蒸馏水调零。
- 2、按下表步骤加样：

试剂名称 (μL)	测定管	空白管
MDA 检测工作液	300	300
蒸馏水	-	100
样本	100	-
试剂三	100	100

混合液在 100°C 水浴中保温 60min 后（盖紧，防止水分散失），置于冰浴中冷却，10000g，常温，离心 10min。吸取 200μL 上清液于微量玻璃比色皿或 96 孔板中，测定各样本在 532nm 和 600nm 处的吸光度。分别计算  $\Delta A_{532} = A_{532 \text{ 测定}} - A_{532 \text{ 空白}}$ ， $\Delta A_{600} = A_{600 \text{ 测定}} - A_{600 \text{ 空白}}$ ， $\Delta A = \Delta A_{532} - \Delta A_{600}$ （空白管只需做 1-2 次）。

注意高脂血或者油脂类样本在操作表中空白管的蒸馏水应以（33μL 蒸馏水+67μL 乙醇）代替

## 三、MDA 含量计算

### A、按微量比色皿计算

- (1) 按照蛋白浓度计算

$$\text{MDA 含量 (nmol/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样本}}) \times F = 32.258 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \times F$$

- (2) 按照样本质量计算

$$\text{MDA 含量 (nmol/g 质量)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}}) \times F = 32.258 \times \Delta A \div W \times F$$

- (3) 按照细菌或细胞数量计算

$$\text{MDA 含量 (nmol/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}}) \times F = 0.0645 \times \Delta A \times F$$

- (4) 按照血清（浆）体积计算

$$\text{MDA 含量 (nmol/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样本}} \times F = 32.258 \times \Delta A \times F$$

V 反应：反应体系总体积， $5 \times 10^{-4}$ L； $\epsilon$ ：MDA 摩尔吸光系数， $1.55 \times 10^5$  L/mol/cm；V 样本：加入样本体积，0.1mL；d：比色皿光径，1cm；V 提取：加入提取液体积，1mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细胞或细菌总数，500 万； $10^9$ ：单位换算系数， $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ ；F：稀释倍数，高脂血或者油脂类样本需乘以稀释倍数。

### B、按 96 孔板计算

- (1) 按照蛋白浓度计算

$$\text{MDA 含量 (nmol/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样本}}) \times F = 53.763 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \times F$$

- (2) 按照样本质量计算

$$\text{MDA 含量 (nmol/g 质量)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}}) \times F = 53.763 \times \Delta A \div W \times F$$

- (3) 按照细菌或细胞数量计算

$$\text{MDA 含量 (nmol/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}}) \times F = 0.1075 \times \Delta A \times F$$

- (4) 按照血清（浆）体积计算

$$\text{MDA 含量 (nmol/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样本}} \times F = 53.763 \times \Delta A \times F$$

V 反应：反应体系总体积， $5 \times 10^{-4}$ L； $\epsilon$ ：MDA 摩尔吸光系数， $1.55 \times 10^5$  L/mol/cm；V 样本：加入样本体积，0.1mL；d：96 孔板光径，0.6cm；V 提取：加入提取液体积，1mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细胞或细菌总数，500 万； $10^9$ ：单位换算系数， $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ ；F：稀释倍数，高脂血或者油脂类样本需乘以稀释倍数。

### 注意事项:

1. 若发现检测样本吸光值过低, 可以将沸水浴时间 60min 调整为 90min 或者更长, 但同一实验中的 MDA 的检测都需要延长到同一时间以免引起误差。

### 实验实例:

- 1、取马血清按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算  $\Delta A_{532} = A_{532 \text{ 测定}} - A_{532 \text{ 空白}} = 0.078 - 0.047 = 0.031$ ,  $\Delta A_{600} = A_{600 \text{ 测定}} - A_{600 \text{ 空白}} = 0.053 - 0.043 = 0.01$ ,  $\Delta A = \Delta A_{532} - \Delta A_{600} = 0.021$  按体积计:  
MDA 含量 (nmol/mL) =  $53.763 \times \Delta A \times F = 1.129 \text{ nmol/mL}$ 。
- 2、取 500 万 hela 细胞, 加 1mL 提取液进行样本处理, 离心取上清后按测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算  $\Delta A_{532} = A_{532 \text{ 测定}} - A_{532 \text{ 空白}} = 0.101 - 0.046 = 0.055$ ,  $\Delta A_{600} = A_{600 \text{ 测定}} - A_{600 \text{ 空白}} = 0.043 - 0.043 = 0$ ,  $\Delta A = \Delta A_{532} - \Delta A_{600} = 0.055$ , 按照细菌或细胞数量计算:  
MDA 含量 (nmol/10<sup>4</sup> cell) =  $0.1075 \times \Delta A \times F = 0.006 \text{ nmol/10}^4 \text{ cell}$
- 3、取 0.1g 小鼠肝脏, 加 1mL 提取液进行样本处理, 离心取上清后按测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算  $\Delta A_{532} = A_{532 \text{ 测定}} - A_{532 \text{ 空白}} = 0.196 - 0.047 = 0.149$ ,  $\Delta A_{600} = A_{600 \text{ 测定}} - A_{600 \text{ 空白}} = 0.125 - 0.043 = 0.082$ ,  $\Delta A = \Delta A_{532} - \Delta A_{600} = 0.067$ , 按照样本质量计算:  
MDA 含量 (nmol/g 质量) =  $53.763 \times \Delta A \div W \times F = 36.02 \text{ nmol/g 质量}$

### 相关发表文献:

- [1] QianYi Peng, YiMin Wang, CaiXia Chen, et al. Inhibiting the CD38/cADPR pathway protected rats against sepsis associated brain injury. *Brain Research*. January 2018;(IF2.929)
- [2] Zhigang Chen, Qiaoling Yuan, Guangren Xu, et al. Effects of Quercetin on Proliferation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Apoptosis of Intestinal Porcine Enterocyte Cells. *Molecules*. 2018;(IF3.06)
- [3] Huiwen Xiao, Yuan Li, Dan Luo, et al. Hydrogen-water ameliorates radiation-induced gastrointestinal toxicity via MyD88's effects on the gut microbiota. *experimental and molecular medicine*. January 2018;(IF4.743)
- [4] Xuejuan Xia, Yuxiao, Xing, Guannan Li, et al. Antioxidant activity of whole grain Qingke (Tibetan *Hordeum vulgare* L.) toward oxidative stress in d-galactose induced mouse model. *Journal of Functional Foods*. June 2018;(IF3.197)
- [5] Qilong Wang, Guosheng Xiao, Guoliang Chen, et al. Toxic effect of microcystin-LR on blood vessel development. *Toxicological & Environmental Chemistry*. Feb 2019;(IF3.547)
- [6] Zeyong Zhang, Huanhuan Liu, Ce Sun, et al. A C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc-finger protein OsZFP213 interacts with OsMAPK3 to enhance salt tolerance in rice. *Journal of Plant Physiology*. October 2018;(IF2.825)
- [7] Lijiao Gu, Hantao Wang, Hengling Wei, et al. Identification, Expression, and Functional Analysis of the Group II WRKY Subfamily in Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L). *Frontier in Immunology*. November 2018;(IF4.259)
- [8] Ping Shao, Pei Wang, Ben Niu, et al. Environmental stress stability of pectin-stabilized resveratrol liposomes with different degree of esterification. *International Journal of Biological Macromolecules*. November 2018;(IF4.784)

### 参考文献:

- [1] Spitz D R , Oberley L W . An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates[J]. *Analytical Biochemistry*, 1989

[2] Masayasu M , Hiroshi Y . A simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use[J]. Clinica Chimica Acta.

**相关系列产品:**

- BC3590/BC3595 过氧化氢 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 含量检测试剂盒
- BC1090/BC1095 黄嘌呤氧化酶 (XOD) 活性检测试剂盒
- BC0690/BC0695 葡萄糖氧化酶 (GOD) 活性检测试剂盒
- BC1270/BC1275 蛋白质羰基含量检测试剂盒
- BC1280/BC1285 二胺氧化酶 (DAO) 活性检测试剂盒
- BC1290/BC1295 超氧阴离子含量检测试剂盒