

丙二醛 (MDA) 含量检测试剂盒说明书

可见分光光度法

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：BC0020

规格：50T/48S

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 60 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 42 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	粉剂×2 瓶	2-8°C保存
试剂三	液体 12 mL×1 瓶	2-8°C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 20 mL 试剂一，溶解混匀，2-8°C保存一个月。MDA 检测工作液较难溶解，可以 70°C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、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、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、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°C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°C离心 10min，取上清，置冰上待测。

3、血清（浆）：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（66μL 蒸馏水+134μL 乙醇）代替。

二、测定步骤

1、分光光度计预热 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	600	600
蒸馏水	-	200
样本	200	-
试剂三	200	200

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。取上清至 1mL 玻璃比色皿中，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

(1) 按照蛋白浓度计算

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

(2) 按照样本质量计算

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

(3) 按照细菌或细胞数量计算

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

(4) 按照血清（浆）体积计算

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

V 反总：反应体系总体积，0.001L； ϵ ：MDA 摩尔吸光系数， $1.55 \times 10^5 \text{ L/mol/cm}$ ；V 样本：加入样本体积，0.2mL；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。

注意事项：

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、取羊血清按照测定步骤操作，测得并计算 $\Delta A_{532}=A_{532 \text{ 测定}}-A_{532 \text{ 空白}}=0.124-0.01=0.114$ ， $\Delta A_{600}=A_{600 \text{ 测定}}-A_{600 \text{ 空白}}=0.057-0.002=0.055$ ， $\Delta A=\Delta A_{532}-\Delta A_{600}=0.059$ 按体积计：

$$\text{MDA 含量 (nmol/mL)} = 32.258 \times \Delta A \times F = 1.903\text{nmol/mL}。$$

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，测定并计算 $\Delta A_{532}=A_{532 \text{ 测定}}-A_{532 \text{ 空白}}=0.152-0.01=0.141$ ， $\Delta A_{600}=A_{600 \text{ 测定}}-A_{600 \text{ 空白}}=0.008-0.004=0.004$ ， $\Delta A=\Delta A_{532}-\Delta A_{600}=0.137$ 按照细菌或细胞数量计算：

$$\text{MDA 含量 (nmol/10}^4 \text{ cell)} = 0.0645 \times \Delta A \times F = 0.0088\text{nmol/10}^4 \text{ cell}$$

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，测定并计算 $\Delta A_{532} = A_{532 \text{ 测定}} - A_{532 \text{ 空白}} = 0.212 - 0.01 = 0.202$ ， $\Delta A_{600} = A_{600 \text{ 测定}} - A_{600 \text{ 空白}} = 0.046 - 0.002 = 0.044$ ， $\Delta A = \Delta A_{532} - \Delta A_{600} = 0.158$ 按照样本质量计算：

$$\text{MDA 含量 (nmol/g 质量)} = 32.258 \times \Delta A \div W = 50.968 \text{ nmol/g 质量}$$

相关发表文献：

[1] Guoyue Liu, Hong Mei, Miao Chen, et al. Protective effect of agmatine against hyperoxia-induced acute lung injury via regulating lncRNA gadd7. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. August 2019; 516(1):68-74. (IF2.705)

[2] Wenzhen An, Ying Zhang, Xuan Zhang, et al. Ocular toxicity of reduced graphene oxide or graphene oxide exposure in mouse eyes. *Experimental Eye Research*. September 2018; (IF2.998)

[3] Siyang Yu, Bo Dong, Zhenfei Fang, et al. Knockdown of lncRNA AK139328 alleviates myocardial ischaemia/reperfusion injury in diabetic mice via modulating miR-204-4p and inhibiting autophagy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. July 2018; (IF4.658)

[4] Zhigang Chen, Qiaoling Yuan, Guangren Xu, et al. Effects of Quercetin on Proliferation and H₂O₂-Induced Apoptosis of Intestinal Porcine Enterocyte Cells. *Molecules*. 2018; (IF3.06)

[5] 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)

[6] Qilong Wang, Guosheng Xiao, Guoliang Chen, et al. Toxic effect of microcystin-LR on blood vessel development. *Toxicological & Environmental Chemistry*. Feb 2019; (IF3.547)

[7] Zeyong Zhang, Huanhuan Liu, Ce Sun, etc. A C₂H₂ zinc-finger protein OsZFP213 interacts with OsMAPK3 to enhance salt tolerance in rice. *Journal of Plant Physiology*. October 2018; (IF2.825)

[8] Ying Zhao, Wengang Yu, Xiangyu Hu, et al. Physiological and transcriptomic analysis revealed the involvement of crucial factors in heat stress response of *Rhododendron hainanense*. *Gene*. June 2018; (IF2.638)

[9] Lijiao Gu, Hantao Wang, Hengling Wei, et al. Identification, Expression, and Functional Analysis of the Group IId WRKY Subfamily in Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Frontier in Immunology*. November 2018; (IF4.259)

[10] 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 (H₂O₂) 含量检测试剂盒

BC1090/BC10905 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