

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℃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 20 mL 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。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、水浴锅/金属浴、台式离心机、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、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℃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、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。





注：该试剂盒的上述 1、2、3 编号的样本匀浆上清也可用于 BC0090/BC0095（过氧化物酶）、BC0170/BC0175（超氧化物歧化酶）、BC5160/BC5165（超氧化物歧化酶）、BC0200/BC0205（过氧化氢酶）、BC0680/BC0685（乳酸脱氢酶）的测定。

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：（**务必先阅读操作表内“注意”事项**）

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℃水浴中保温 60min 后（盖紧缠膜，防止爆盖），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：

- 1) 高脂血或者油脂类样本在操作表中空白管的蒸馏水应以（66μL 蒸馏水+134μL 乙醇）代替；
- 2) 上述反应混合液煮沸时，务必避免液体溅出，时刻注意安全。使用普通扣盖 EP 管可以用封口膜缠口后，使用针头在盖子上扎一小孔防止爆盖，更推荐使用带有螺旋口的 EP 管（也需缠膜），若使用金属浴加热也可用重物压紧管盖。

三、MDA 含量计算

(1) 按照蛋白浓度计算

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

(2) 按照样本质量计算

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

(3) 按照细菌或细胞数量计算

$$\text{MDA 含量 (nmol/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (N \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}}) \times F = 32.258 \times \Delta A \div N \times F$$

(4) 按照体积计算

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

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；C_{pr}：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；N：细胞或细菌总数，以万计； 10^9 ：单位换算系数，1mol= 10^9 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：
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：
MDA 含量 (nmol/ 10^4 cell) = $32.258 \times \Delta A \div N \times F = 0.0088 \text{ nmol}/10^4 \text{ cell}$
- 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：
MDA 含量 (nmol/g 质量) = $32.258 \times \Delta A \div W \times F = 50.968 \text{ nmol/g 质量}$

相关发表文献：

- [1] Lian Q, Liu W, Ma D, Liang Z, Tang Z, Cao J, He C, Xia D. Precisely Orientating Atomic Array in One-Dimension Tellurium Microneedles Enhances Intrinsic Piezoelectricity for an Efficient Piezo-Catalytic Sterilization. ACS Nano. 2023 May 9;17(9):8755-8766. doi: 10.1021/acsnano.3c02044. Epub 2023 Apr 18. PMID: 37070712.
- [2] Jiang F, Jia K, Chen Y, Ji C, Chong X, Li Z, Zhao F, Bai Y, Ge S, Gao J, Zhang X, Li J, Shen L, Zhang C. ANO1-Mediated Inhibition of Cancer Ferroptosis Confers Immunotherapeutic Resistance through Recruiting Cancer-Associated Fibroblasts. Adv Sci (Weinh). 2023 Aug;10(24):e2300881. doi: 10.1002/advs.202300881. Epub 2023 Jun 21. PMID: 37341301; PMCID: PMC10460848.
- [3] Zhang D, Liu J, Zhang Y, Wang H, Wei S, Zhang X, Zhang D, Ma H, Ding Q, Ma L. Morphophysiological, proteomic and metabolomic analyses reveal cadmium tolerance mechanism in common wheat (Triticum aestivum L.). J Hazard Mater. 2023 Mar 5;445:130499. doi: 10.1016/j.jhazmat.2022.130499. Epub 2022 Nov 25. PMID: 36455318.
- [4] Liu X, Cheng C, Min Y, Xie X, Muzahid ANM, Lv H, Tian H, Zhang C, Ye C, Cao S, Chen P, Zhong C, Li D. Increased ascorbic acid synthesis by overexpression of AcGGP3 ameliorates copper toxicity in kiwifruit. J Hazard Mater. 2023 Oct 15;460:132393. doi: 10.1016/j.jhazmat.2023.132393. Epub 2023 Aug 23. PMID: 37660623.

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/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
- BC1290/BC1295 超氧阴离子含量检测试剂盒

