

## 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。

**需自备的仪器和用品：**

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅/金属浴、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/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。





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、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：（**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 | 300 | 300 |
| 蒸馏水       | -   | 100 |
| 样本        | 100 | -   |
| 试剂三       | 100 | 100 |

混合液在 100℃水浴中保温 60min 后，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：

- 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（33μL 蒸馏水+67μL 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

### A、按微量玻璃比色皿计算

（1）按照蛋白浓度计算

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

（2）按照样本质量计算

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

（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， $5 \times 10^{-4}$ 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：微量玻璃比色皿光径，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；N：细胞或细菌总数，以万计； $10^9$ ：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

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

（2）按照样本质量计算

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





### (3) 按照细菌或细胞数量计算

$$\text{MDA 含量 (nmol/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (N \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}}) \times F = 53.763 \times \Delta A \div N \times F$$

### (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, 0.1 mL; d: 96 孔板光径, 0.6 cm; V 提取: 加入提取液体积, 1 mL; Cpr: 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,  $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ ; 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 1 mL 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/ $10^4$  cell) =  $53.763 \times \Delta A \div N \times F = 0.006 \text{ nmol/10}^4 \text{ cell}$
- 3、取 0.1g 小鼠肝脏, 加 1 mL 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] Xu J, Xu J, Shi T, Zhang Y, Chen F, Yang C, Guo X, Liu G, Shao D, Leong KW, Nie G. Probiotic-Inspired Nanomedicine Restores Intestinal Homeostasis in Colitis by Regulating Redox Balance, Immune Responses, and the Gut Microbiome. *Adv Mater.* 2023 Jan;35(3):e2207890. doi: 10.1002/adma.202207890. Epub 2022 Dec 15. PMID: 36341495.
- [2] Ma Y, Liu L, Ye Z, Xu L, Li Y, Liu S, Song G, Zhang XB. Engineering of cyanine-based nanoplatfrom with tunable response toward reactive species for ratiometric NIR-II fluorescent imaging in mice. *Sci Bull (Beijing)*. 2023 Oct 30;68(20):2382-2390. doi: 10.1016/j.scib.2023.08.041. Epub 2023 Aug 23. PMID: 37679256.
- [3] Fan R, Chen C, Mu M, Chuan D, Liu H, Hou H, Huang J, Tong A, Guo G, Xu J. Engineering MMP-2 Activated Nanoparticles Carrying B7-H3 Bispecific Antibodies for Ferroptosis-Enhanced Glioblastoma Immunotherapy. *ACS Nano*. 2023 May 23;17(10):9126-9139. doi: 10.1021/acsnano.2c12217. Epub 2023 Apr 25. PMID: 37097811.
- [4] Xu J, Chu T, Yu T, Li N, Wang C, Li C, Zhang Y, Meng H, Nie G. Design of Diselenide-Bridged Hyaluronic Acid Nano-antioxidant for Efficient ROS Scavenging to Relieve Colitis. *ACS Nano*. 2022 Aug 23;16(8):13037-13048. doi: 10.1021/acsnano.2c05558. Epub 2022 Jul 21. PMID: 35861614.





[5] Zhang W, Tang Y, Han Y, Huang L, Zhou W, Zhou C, Hu Y, Lu R, Wang F, Shi W, Liu G. Immunotoxicity of pentachlorophenol to a marine bivalve species and potential toxification mechanisms underpinning. J Hazard Mater. 2022 Oct 5;439:129681. doi: 10.1016/j.jhazmat.2022.129681. Epub 2022 Jul 28. PMID: 36104908.

#### 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

