

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：AC10072

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，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 42 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×2 瓶	4°C保存
试剂三	液体 12 mL×1 瓶	4°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 20mL 试剂一，溶解混匀，4°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过氧化脂质的含量。但是测定植物组织中 MDA 时受多种物质的干扰，其中最主要的是可溶性糖，糖与 TBA 显色反应产物的最大吸收波长在 450nm，但 532nm 处也有吸收。所以同时测定 600nm、532nm、450nm 下的吸光度，利用 532nm 与 450nm、600nm 下的吸光度的差值计算 MDA 的含量。

由于植物中受蔗糖干扰较大，动物中受葡萄糖干扰较大，所以本试剂盒有针对蔗糖和葡萄糖的两个公式。若所测样本为油脂类物质，则两个公式均可。

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°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℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

3、血清（浆）：直接检测。

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℃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 200 μL 上清液于微量玻璃比色皿或 96 孔板中，测定各样本在 450nm、532nm 和 600nm 处的吸光度。分别计算 $\Delta A_{450}=A_{450 \text{ 测定}}-A_{450 \text{ 空白}}$ ， $\Delta A_{532}=A_{532 \text{ 测定}}-A_{532 \text{ 空白}}$ ， $\Delta A_{600}=A_{600 \text{ 测定}}-A_{600 \text{ 空白}}$ 。（空白管只需做 1-2 次）

三、MDA 含量计算

A、按 96 孔板计算

1、细菌、细胞或动物组织中 MDA 含量计算

（1）按照蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{MDA 含量 (nmol/mg prot)} &= (12.9 \times (\Delta A_{532} - \Delta A_{600}) - 2.58 \times \Delta A_{450}) \times V_{\text{总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样本}}) \\ &= 5 \times (12.9 \times (\Delta A_{532} - \Delta A_{600}) - 2.58 \times \Delta A_{450}) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

（2）按照样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{MDA 含量 (nmol/g 质量)} &= (12.9 \times (\Delta A_{532} - \Delta A_{600}) - 2.58 \times \Delta A_{450}) \times V_{\text{总}} \div (W \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}}) \\ &= 5 \times (12.9 \times (\Delta A_{532} - \Delta A_{600}) - 2.58 \times \Delta A_{450}) \div W \end{aligned}$$

（3）按照细菌或细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{MDA 含量 (nmol}/10^4 \text{ cell)} &= (12.9 \times (\Delta A_{532} - \Delta A_{600}) - 2.58 \times \Delta A_{450}) \times V_{\text{总}} \div (500 \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样本}}) \\ &= 0.01 \times (12.9 \times (\Delta A_{532} - \Delta A_{600}) - 2.58 \times \Delta A_{450}) \end{aligned}$$

（4）按照血清（浆）体积计算

$$\begin{aligned} \text{MDA 含量 (nmol/mL)} &= (12.9 \times (\Delta A_{532} - \Delta A_{600}) - 2.58 \times \Delta A_{450}) \times V_{\text{总}} \div V_{\text{样本}} \\ &= 5 \times (12.9 \times (\Delta A_{532} - \Delta A_{600}) - 2.58 \times \Delta A_{450}) \end{aligned}$$

V 总：反应体系总体积，0.5mL；V 样本：加入样本体积，0.1 mL；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；V 提取：提取液体积，1mL。

2、植物组织中 MDA 含量计算

（1）按照样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{MDA 含量 (nmol/g 质量)} &= (12.9 \times (\Delta A_{532} - \Delta A_{600}) - 1.12 \times \Delta A_{450}) \times V_{\text{总}} \div (W \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}}) \\ &= 5 \times (12.9 \times (\Delta A_{532} - \Delta A_{600}) - 1.12 \times \Delta A_{450}) \div W \end{aligned}$$

（2）按照蛋白浓度计算

$$\text{MDA 含量 (nmol/mg prot)} = (12.9 \times (\Delta A_{532} - \Delta A_{600}) - 1.12 \times \Delta A_{450}) \times V_{\text{总}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样本}}) \\ = 5 \times (12.9 \times (\Delta A_{532} - \Delta A_{600}) - 1.12 \times \Delta A_{450}) \div \text{Cpr}$$

V 总：反应体系总体积，0.5mL；V 样本：加入样本体积，0.1 mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；V 提取：提取液体积，1mL。

B、按微量比色皿计算

1、细菌、细胞或动物组织中 MDA 含量计算

(1) 按照蛋白浓度计算

$$\text{MDA 含量 (nmol/mg prot)} = (6.45 \times (\Delta A_{532} - \Delta A_{600}) - 1.29 \times \Delta A_{450}) \times V_{\text{总}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样本}}) \\ = 5 \times (6.45 \times (\Delta A_{532} - \Delta A_{600}) - 1.29 \times \Delta A_{450}) \div \text{Cpr}$$

(2) 按照样本质量计算

$$\text{MDA 含量 (nmol/g 质量)} = (6.45 \times (\Delta A_{532} - \Delta A_{600}) - 1.29 \times \Delta A_{450}) \times V_{\text{总}} \div (W \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}}) \\ = 5 \times (6.45 \times (\Delta A_{532} - \Delta A_{600}) - 1.29 \times \Delta A_{450}) \div W$$

(3) 按照细菌或细胞数量计算

$$\text{MDA 含量 (nmol/10}^4 \text{ cell)} = (6.45 \times (\Delta A_{532} - \Delta A_{600}) - 1.29 \times \Delta A_{450}) \times V_{\text{总}} \div (500 \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}}) \\ = 0.01 \times (6.45 \times (\Delta A_{532} - \Delta A_{600}) - 1.29 \times \Delta A_{450})$$

(4) 按照血清（浆）体积计算

$$\text{MDA 含量 (nmol/mL)} = (6.45 \times (\Delta A_{532} - \Delta A_{600}) - 1.29 \times \Delta A_{450}) \times V_{\text{总}} \div V_{\text{样本}} \\ = 5 \times (6.45 \times (\Delta A_{532} - \Delta A_{600}) - 1.29 \times \Delta A_{450})$$

V 总：反应体系总体积，0.5mL；V 样本：加入样本体积，0.1 mL；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；V 提取：提取液体积，1mL。

2、植物组织中 MDA 含量计算

(1) 按照样本质量计算

$$\text{MDA 含量 (nmol/g 质量)} = (6.45 \times (\Delta A_{532} - \Delta A_{600}) - 0.56 \times \Delta A_{450}) \times V_{\text{总}} \div (W \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}}) \\ = 5 \times (6.45 \times (\Delta A_{532} - \Delta A_{600}) - 0.56 \times \Delta A_{450}) \div W$$

(2) 按照蛋白浓度计算

$$\text{MDA 含量 (nmol/mg prot)} = (6.45 \times (\Delta A_{532} - \Delta A_{600}) - 0.56 \times \Delta A_{450}) \times V_{\text{总}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样本}}) \\ = 5 \times (6.45 \times (\Delta A_{532} - \Delta A_{600}) - 0.56 \times \Delta A_{450}) \div \text{Cpr}$$

V 总：反应体系总体积，0.5mL；V 样本：加入样本体积，0.1 mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；V 提取：提取液体积，1mL。

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、取血浆按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算 $\Delta A_{450} = A_{450 \text{ 测定}} - A_{450 \text{ 空白}} = 0.320 - 0.052 = 0.268$ ， $\Delta A_{532} = A_{532 \text{ 测定}} - A_{532 \text{ 空白}} = 0.168 - 0.046 = 0.122$ ， $\Delta A_{600} = A_{600 \text{ 测定}} - A_{600 \text{ 空白}} = 0.093 - 0.043 = 0.05$ ，按血浆体积计：

MDA 含量 (nmol/mL) = $5 \times (12.9 \times (\Delta A_{532} - \Delta A_{600}) - 2.58 \times \Delta A_{450}) = 1.1868 \text{ nmol/mL}$ 。

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
 $\Delta A_{450} = A_{450 \text{ 测定}} - A_{450 \text{ 空白}} = 0.097 - 0.052 = 0.045$ ， $\Delta A_{532} = A_{532 \text{ 测定}} - A_{532 \text{ 空白}} = 0.101 - 0.046 = 0.055$ ， $\Delta A_{600} = A_{600 \text{ 测定}} - A_{600 \text{ 空白}} = 0.043 - 0.043 = 0$ ，按照细菌或细胞数量计算：

MDA 含量 (nmol/10⁴ cell) = $0.01 \times (12.9 \times (\Delta A_{532} - \Delta A_{600}) - 2.58 \times \Delta A_{450}) = 0.01 \times (12.9 \times (0.055 - 0) - 2.58 \times 0.045) = 0.0059 \text{ nmol/10}^4 \text{ cell}$

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 H₂O₂-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 C₂H₂ 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 IId 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*.