北京沃凯生物科技有限公司
全国免费电话:400-819-385
www.bjoka-vip.com
Tel:010-62971590. Fax:62340519
M-ail:postmaster@oka-vip.com

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：D17050

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。

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 ΔA532=A532 $_{测定}$-A532 $_{空白}$，ΔA600=A600 $_{测定}$-A600 $_{空白}$，ΔA=ΔA532-ΔA600（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

MDA 含量（nmol/mg prot）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(Cpr×V 样本) ×F=32.258×ΔA÷Cpr×F

（2）按照样本质量计算

MDA 含量（nmol/g 质量）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(W×V 样本÷V 提取) ×F = 32.258×ΔA÷W×F

（3）按照细菌或细胞数量计算

MDA 含量（nmol/10^4 cell）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9] ÷(N×V 样本÷V 提取) ×F = 32.258×ΔA÷N×F

（4）按照体积计算

MDA 含量（nmol/mL）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷V 样本×F =32.258×ΔA×F

V 反总：反应体系总体积，5×10^{-4}L；ε: MDA 摩尔吸光系数，1.55×10^5 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，1mol=10^9nmol；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

MDA 含量（nmol/mg prot）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(Cpr×V 样本) ×F =53.763×ΔA÷Cpr×F

（2）按照样本质量计算

MDA 含量（nmol/g 质量）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(W×V 样本÷V 提取) ×F = 53.763×ΔA÷W×F

（3）按照细菌或细胞数量计算

MDA 含量（nmol/10^4 cell）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9] ÷(N×V 样本÷V 提取) ×F = 53.763×ΔA÷N×F

（4）按照体积计算

MDA 含量（nmol/mL）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷V 样本×F =53.763×ΔA×F

V 反总：反应体系总体积，5×10^{-4}L；ε: MDA 摩尔吸光系数，1.55×10^{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；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：

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 ΔA532=A532 $_{测定}$-A532 $_{空白}$=0.078-0.047=0.031，ΔA600=A600 $_{测定}$-A600 $_{空白}$=0.053-0.043=0.01，ΔA=ΔA532-ΔA600=0.021，按体积计：

MDA 含量（nmol/mL）=53.763×ΔA×F =1.129 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 ΔA532=A532 $_{测定}$-A532 $_{空白}$=0.101-0.046=0.055，ΔA600=A600 $_{测定}$-A600 $_{空白}$=0.043-0.043=0，ΔA=ΔA532-ΔA600 = 0.055，按照细菌或细胞数量计算：

MDA 含量（nmol/10^{4} cell）=53.763×ΔA÷N×F =0.006nmol/10^{4} 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 ΔA532=A532 $_{测定}$-A532 $_{空白}$=0.196-0.047=0.149，ΔA600=A600 $_{测定}$-A600 $_{空白}$=0.125-0.043=0.082，ΔA=ΔA532-ΔA600= 0.067，按照样本质量计算：

MDA 含量（nmol/g 质量）= 53.763×ΔA÷W×F =36.02 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 nanoplatform 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 uses[J]. Clinica Chimica Acta.