

# M5 HiPer 丙二醛 (MDA) 检测试剂盒 使用说明书

Product	Unit	Cat.#
M5 HiPer 丙二醛 (MDA) 检测试剂盒	50T	MF607-01

**【储存温度】**：4℃保存。

**【组分】**：

提取液：液体 50mL×1 瓶，4℃保存；  
试剂一：液体 30mL×1 瓶，4℃保存；  
试剂二：粉剂×2 瓶，4℃保存；

MDA 检测工作液的配制：用时在每瓶试剂二中加入 15mL 试剂一，溶解混匀，4℃保存待用。

试剂三：液体 10mL×1 瓶，4℃保存；

**注意事项**：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。

**【产品介绍】**：

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品中过氧化脂质的含量。但是测定动植物组织中 MDA 时受多种物质的干扰，其中最主要的是可溶性糖，其与 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。若所测样品为油脂类物质，则两个公式均可。

**【所需仪器和试剂】**：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、冰和蒸馏水。

**【操作步骤】**：

**一、MDA 提取：**

- 1、细菌、细胞样品的制备：收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照每 400 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 20%，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
2. 组织样品的制备：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、MDA 测定：**

- 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	测定管	空白管
MDA 检测工作液 (μL)	600	600
蒸馏水 (μL)	-	200
样本 (μL)	200	-
试剂三 (μL)	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, 测定各样品在 450nm、532nm 和 600nm 处的吸光度, 分别计算  $\Delta A_{450} = A_{450}$  测定 -  $A_{450}$  空白,  $\Delta A_{532} = A_{532}$  测定 -  $A_{532}$  空白,  $\Delta A_{600} = A_{600}$  测定 -  $A_{600}$  空白。空白管只需做 1-2 次。

### 三、MDA 含量计算:

#### 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) 按照样品质量计算

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

(3) 按照细菌或细胞密度计算:

$$\text{MDA 含量 (nmol/10}^4 \text{ cell)} = (6.45 \times (\Delta A_{532} - \Delta A_{600}) - 1.29 \times \Delta A_{450}) \times V_{\text{总}} \div (400 \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}}) \\ = 0.0125 \times (6.45 \times (\Delta A_{532} - \Delta A_{600}) - 1.29 \times \Delta A_{450})$$

(4) 按血清 (浆) 体积计算:

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

$V_{\text{总}}$ : 反应体系总体积, 1mL;  $V_{\text{样本}}$ : 加入样品体积, 0.2 mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL;  $W$ : 样品质量, g; 400: 细胞或细菌总数, 400 万;  $V_{\text{提取}}$ : 提取液体积, 1mL。

#### 2、植物组织中 MDA 含量计算

(1) 按照样品质量计算

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

(2) 按照蛋白浓度计算

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

$V_{\text{总}}$ : 反应体系总体积, 1mL;  $V_{\text{样本}}$ : 加入样品体积, 0.2 mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL;  $W$ : 样品质量, g;  $V_{\text{提取}}$ : 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。

**Please note: All products are "FOR RESEARCH USE ONLY AND ARE NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC OR THERAPEUTIC USE"**