CheKine™ Plus 丙二醛（MDA）含量检测试剂盒（微量法）

货号: KTB1052　　规格: 48 T/48 S　96 T/96 S　　批号：见产品标签

	适用样本：动植物组织、细胞、细菌、血清（浆）、尿液、高血脂和油脂类样本
	保质期：4℃，避光保存 24 个月

01 背景与原理

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包括丙二醛（MDA），通过检测 MDA 的水平即可反映样本脂质过氧化的水平。

本试剂盒检测原理是在酸性和高温条件下，MDA 与硫代巴比妥酸（Thiobarbituric acid，TBA）发生缩合反应，生成红色的 MDA-TBA 加合物，其在 532 nm 处具有最大吸光度。同时测定 600 nm 处的吸光度值，消除非特异干扰，计算 532 nm 与 600 nm 的吸光度的差值即可计算样本中 MDA 的含量。

本试剂盒通过添加新型稳定剂，提高灵敏度和显色效率，更加适配复杂样本基质。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Extraction Buffer	60 mL	120 mL	4℃
Reagent Ⅰ	12 mL	24 mL	4℃，避光保存
Reagent Ⅱ	6 mL	12 mL	4℃，避光保存
Reagent Ⅲ	3 mL	6 mL	4℃
Reagent Ⅳ	3 mL	6 mL	4℃，避光保存

***请在实验前检查各组分的量。**

***各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行标准曲线制作或预实验。**

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 532 nm 和 600 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通透明板
试剂	PBS、去离子水	样本清洗用/检测体系配制用
其他	匀浆器（组织样本）、恒温水浴锅、超声破碎仪（细胞或细菌）、冰盒、低温离心机、可调节式移液枪及枪头	/

04 注意事项

- **正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。**
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，**请在实验全程做好生物安全防护**，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Extraction Buffer	即用型	实验过程中冰上放置；4℃保存
Reagent Ⅰ	即用型；使用前平衡到室温	4℃避光保存
Reagent Ⅱ	即用型；使用前平衡到室温	4℃避光保存
Reagent Ⅲ	即用型；使用前平衡到室温	4℃会凝固，需平衡到室温混匀后再使用；4℃保存
Reagent Ⅳ	即用型；使用前平衡到室温	4℃避光保存

05-2 样本制备

注意：推荐使用新鲜样本。样本尽量新鲜提取，如果不能当天提取，则把完整细胞或者分装的组织块保存在-80℃，一个月内使用。当准备好进行该项实验时，将样本从-80℃拿出后，冰上解冻。但是请注意，这可能会影响样本的稳定性，实验结果可能会低于预期。

- **动植物组织：**称取 0.1 g 组织，加入 1 mL Extraction Buffer，将样本进行冰浴匀浆。匀浆后的样本，4℃，8000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。
- **细胞（菌）：**收集 5×10^6 个细胞（菌），用预冷的 PBS 清洗细胞（菌）后，4℃，800 g 离心 2 min，弃上清。加入 0.5 mL Extraction Buffer 重悬细胞（菌），冰浴超声波破碎 5 min（功率 20%或 200W，超声 3 s，间隔 7s，重复 30 次），4℃，8000 g 离心 10 min，取上清液置冰上待测。

- **血清（浆）、尿液等液体样本：**可直接用来检测，如果有必要，建议将样本稀释成不同的浓度后，再进行检测。
- **高血脂或者油脂类样本：**取 40 μL 样本和 80 μL 无水乙醇混合（即样本被稀释 3 倍），涡旋震荡 5 min 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去离子水应以去离子水与无水乙醇按体积比 66：134 配制的液体代替。

05-3 实验步骤

注意：空白管只需做一管。

1. **酶标仪准备**：预热 30 min 以上，调节波长到 532 nm 和 600 nm。
2. **检测体系配制**：在螺口 EP 管中操作（**盖紧螺口盖，以防止水分散失及加热时盖子爆开**），按如下步骤进行。

试剂	测定管（μL）	空白管（μL）
样本	100	0
去离子水	0	100
Reagent Ⅰ	200	200
Reagent Ⅱ	100	100
Reagent Ⅲ	50	50
Reagent Ⅳ	50	50

3. **吸光度检测：**充分混匀，95℃水浴孵育 30 min 后，置于冰浴中冷却，10000 g，室温（25℃）离心 10 min。取 200 μL 上清到 96 孔板中，在 532 nm 和 600 nm 处读取吸光度值，分别记为 $A_{测定}$和 $A_{空白}$。**注意：往 96 孔板中加样时，可能会产生气泡，尽量避免移液器吸头出液口接触 96 孔板孔壁可以极大减少气泡产生。若产生了单个小气泡，不影响检测结果；若有多个气泡或较大的气泡，建议将气泡戳破后再检测，以免影响检测结果。**

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧**二维码**或访问官网[https://www.abbkine.cn] **>** 进入“**技术中心**”**>** 查找“**在线计算器**”**工具**。

06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算$\Delta A=A_{532}-A_{600}$，$\Delta\Delta A_{测定}=\Delta A_{测定}-\Delta A_{空白}$。

2. MDA 含量计算

- 按样本质量计算

$MDA\ (nmol/g)=[\Delta\Delta A_{测定}\times V_{反总}\div(\varepsilon\times d)\times 10^{9}]\div(W\times V_{样}\div V_{样总})\times n=\mathbf{64.52\times\Delta\Delta A_{测定}\div W\times n}$

- 按细菌或细胞数量计算

$MDA\ (nmol/10^{4})=[\Delta\Delta A_{测定}\times V_{反总}\div(\varepsilon\times d)\times 10^{9}]\div(N\times V_{样}\div V_{样总})\times n=\mathbf{32.26\times\Delta\Delta A_{测定}\div N\times n}$

- 按液体体积计算

MDA (nmol/ mL)=[ΔΔA $_{测定}$×V $_{反总}$÷(ε×d)×10^9]÷V $_{样}$×n=**64.52×ΔΔA $_{测定}$×n**

- 按蛋白浓度计算

MDA (nmol/ mg prot)=[ΔΔA $_{测定}$×V $_{反总}$÷(ε×d)×10^9]÷(Cpr×V $_{样}$)×n=**64.52×ΔΔA $_{测定}$÷Cpr×n**

V $_{反总}$：反应体系总体积，$5×10^{-4}$ L；ε：MDA 摩尔消光系数，$1.55×10^5$ L/mol/cm；d：96 孔板光径，0.5 cm；10^9：1 mol=$1×10^9$ nmol；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；V $_{样}$：加入样本体积，0.1 mL；W：样本质量，g；V $_{样总}$：加入组织提取液体积，1 mL，加入细胞(菌)提取液体积，0.5 mL；N：细胞或细菌数量，以 10^4 为单位（例如细胞数量为 $5×10^6$，N=500），n：样本稀释倍数。

07 结果展示

示例-1：取 0.1 g 兔肝脏，按照测定步骤操作，用 96 孔板进行检测。测得ΔA $_{测定}$ = A $_{测定532}$ - A $_{测定600}$ = 0.2940 - 0.0610 = 0.2330，ΔA $_{空白}$ = A $_{空白532}$ - A $_{空白600}$ = 0.0453 - 0.0410 = 0.0043，ΔΔA $_{测定}$=ΔA $_{测定}$-ΔA $_{空白}$=0.2330-0.0043=0.2287。按样本质量计算得：MDA(nmol/g)=64.52×ΔΔA $_{测定}$÷W×n=147.56 nmol/g。

08 FAQ

- **检测得到的样本ΔΔA $_{测定}$过高或者过低怎么办?**

如果ΔΔA $_{测定}$大于 1.6，样本可用对应的提取液进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数；如果ΔΔA $_{测定}$小于 0.01，可提高样本量或者减少提取液体积。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1200	CheKine™ 蛋白质羰基含量检测试剂盒（微量法）
KTB1220	CheKine™ 二胺氧化酶（DAO）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1310	CheKine™ 葡萄糖氧化酶活性（GOD）检测试剂盒（微量法）

CheKine™ Plus 丙二醛（MDA）含量检测流程示意图

（Abbkine 货号：KTB1052）

样本处理



根据实际需求对样本稀释或不稀释



样本用无水乙醇稀释3倍，涡旋震荡5 min后使用。空白管的去离子水应以去离子水与无水乙醇按体积比66：134配制的液体代替



称取约0.1 g组织样本，加入1 mL Extraction Buffer，快速冰上匀浆





收集5×10^{6}个细胞（菌），用预冷的PBS清洗细胞（菌）后，4℃，800 g离心2 min，弃上清。加入0.5 mL Extraction Buffer重悬细胞（菌），冰浴超声波破碎5 min（功率20%或200W，超声3 s，间隔7s，重复30次）



8000 g，4℃离心10 min，取上清液置冰上待测

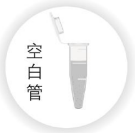


在螺口EP管中操作（盖紧螺口盖，以防止水分散失及加热时盖子爆开），按如下步骤进行

体系配置



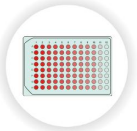
样本	100 μL
Reeagent I	200 μL
Reeagent II	100 μL
Reeagent III	50 μL
Reeagent IV	50 μL



去离子水	100 μL
Reeagent I	200 μL
Reeagent II	100 μL
Reeagent III	50 μL
Reeagent IV	50 μL

充分混匀，95℃水浴孵育30 min后，置于冰浴中冷却，10000 g，室温（25℃）离心10 min。取200 μL上清到96孔板中

数据检测



测定532 nm和600nm处吸光度
结果计算

V1.0