（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

产品货号：E-BC-K814-M

产品规格：48T(44 samples)/96T(92 samples)

检测仪器：酶标仪(530-540 nm)

Elabscience®细胞丙二醛（MDA）比色法测试盒（增强型）

Enhanced Cell Malondialdehyde (MDA) Colorimetric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100
邮箱：biochemical@elabscience.cn
网址：www.elabscience.cn

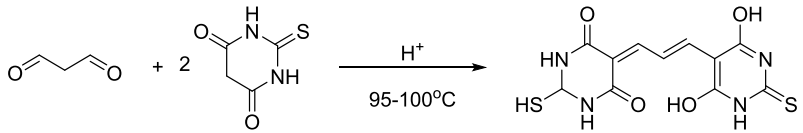
具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测细胞样本中的丙二醛(MDA)含量。

检测原理

过氧化脂质降解产物中的丙二醛(MDA)在高温及酸性环境下可与硫代巴比妥酸(TBA)反应产生红棕色产物 3,5,5'-三甲基恶唑 2,4-二酮(三甲川)，该物质在 532 nm 处有最大吸收峰。



本试剂盒检测细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法(货号：E-BC-K318-M)。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	澄清剂 (Clarificant)	3 mL×1 瓶	6 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	酸试剂 A (Acid Reagent A)	1 mL×1 支	1 mL×1 支	2-8℃ 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	显色剂 (Chromogenic Agent)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	2-8℃避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	10 nmol/mL 标准品 (10 nmol/mL Standard)	5 mL×1 瓶	5 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	裂解液 (Lysis Solution)	30 mL×1 瓶	60 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	稀释液 (Diluent Solution)	1.8 mL×1 支	3.6 mL×1 瓶	2-8℃ 避光 保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	酸试剂 B (Acid Reagent B)	6 mL×1 瓶	12 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
	酶标板	48 孔×1 块	96 孔×1 块	无要求
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(530-540 nm，最佳测波长 532 nm)、恒温水浴锅(100 ℃)、恒温箱(37 ℃)

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温(25 ℃)。

② 试剂一2-8 ℃存放时会凝固，使用前37 ℃加热，直到液体透明方可使用。

③ 试剂二应用液的配制：

按试剂二：双蒸水= 1 : 19的比例进行配制，现配现用，8 h内使用有效。

④ 试剂三应用液的配制：

取一支试剂三，加入1.5 mL试剂六，超声振荡至完全溶解，未用完部分-20 ℃保存2个月。

⑤ 试剂五2-8 ℃存放时会析出，使用前37 ℃加热，直到液体透明方可使用。

⑥ 试剂六2-8 ℃存放时会凝固，使用前37 ℃加热，直到液体透明方可使用。

⑦ 工作液的配制：

按试剂一：试剂二应用液：试剂三应用液：双蒸水：试剂七= 0.2 : 3 : 0.25 : 0.7 : 1的比例进行配制，现配现用，2 h内使用有效。

样本准备

① 样本处理

取不少于 2×10^6 个细胞，加试剂五裂解液 0.5 mL，混匀 3 min 后待测。留取部分细胞裂解后悬液，4℃，10000 ×g 离心 10 min，取上清用于蛋白浓度的测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.19-100.00 nmol/mL，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数
2×10^6 个 A549 细胞	不稀释
2×10^6 个 HepG2 细胞	不稀释
2×10^6 个 293T 细胞	不稀释

注：稀释液为试剂五。

实验关键点

① 使用试剂五处理细胞过程中避免气泡产生，同时细胞悬液无肉眼可见絮状物。

② 水浴反应 40 min 时温度要控制在 95-100℃。

③ 吸取上清液到酶标板时，防止产生气泡。

操作步骤

① 空白管：取 0.1 mL 试剂五，加入到 1.5 mL EP 管中。

标准管：取 0.1 mL 10 nmol/mL 标准品，加入到 1.5 mL EP 管中。

样本管：取 0.1 mL 待测样本，加入到 1.5 mL EP 管中。

② 向步骤①中各管加入 0.5 mL 工作液，充分混匀。

③ EP 管口用保鲜膜扎紧，并在保鲜膜上扎一个小孔，100 ℃ 水浴 40 min。

④ 流水冷却至室温，1100 ×g 离心 10 min。

⑤ 取上清液 0.25 mL 到酶标板。

⑥ 酶标仪上测定 532 nm 处的 OD 值。

注：如果不用保鲜膜，可先用注射器针头在 EP 管盖上扎一个小孔，防止水浴时，管盖崩开。

操作表

	空白管	标准管	测定管
试剂五(mL)	0.1	--	--
10 nmol/mL 标准品(mL)	--	0.1	--
待测样本(mL)	--	--	0.1
工作液(mL)	0.5	0.5	0.5
充分混匀，EP 管口用保鲜膜扎紧，并在保鲜膜上扎一个小孔，100 ℃ 水浴 40 min，流水冷却至室温，1100 ×g，离心 10 min，取 0.25 mL 上清液到酶标板中，酶标仪 532 nm，测定各孔 OD 值。			

本试剂盒检测细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法(货号：E-BC-K318-M)。

结果计算

细胞中丙二醛含量计算公式：

$$\underset{(\text{nmol/mgprot})}{\text{MDA}} = \frac{\Delta A_1}{\Delta A_2} \times c \times f \div C_{pr}$$

注解：

ΔA_1：测定管 OD 值-空白管 OD 值

ΔA_2：标准管 OD 值-空白管 OD 值

c：标准品浓度(10 nmol/mL)

f：样本加入检测体系之前的稀释倍数

C_{pr}：待测样本的蛋白浓度(mgprot/mL)

附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	0.19-100.00 nmol/mL	**批间差**	2.3-3.5 %
灵敏度	0.19 nmol/mL	**批内差**	2.1-3.3 %
加标回收率	95-101 %		

附录2 实例分析

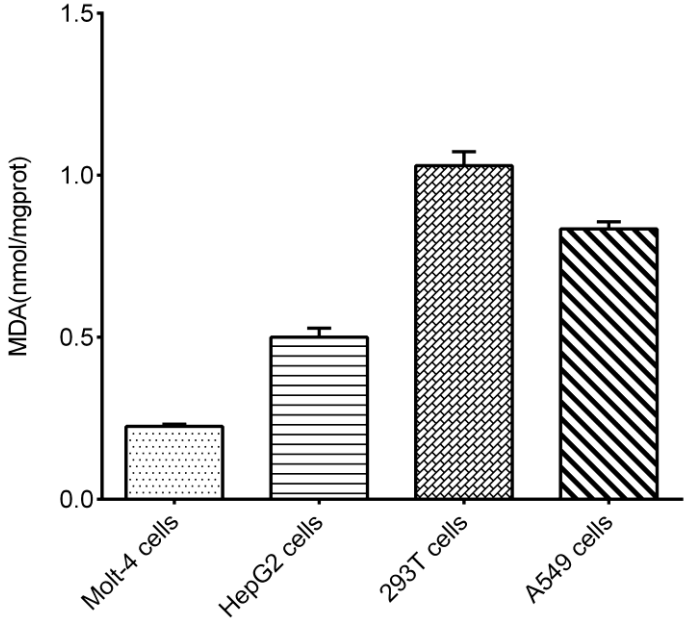
例如检测Molt-4细胞(数据仅供参考):

取0.1 mL Molt-4细胞裂解液，按操作表检测，结果如下：

空白管OD值为0.039，标准管OD值为0.324，测定管OD值为0.054，同时测得悬液蛋白浓度为2.28 mgprot/mL，代入公式计算得：

$$\text{MDA 含量 (nmol/mgprot)} = \frac{0.054 - 0.039}{0.324 - 0.039} \times 10 \div 2.28 = 0.23 \text{ nmol/mgprot}$$

按照说明书操作，测定Molt-4细胞(2×10^6个细胞，加样量0.1 mL，蛋白含量2.28 mgprot/mL)，HepG2细胞(2×10^6个细胞，加样量0.1 mL，蛋白含量3.38 mgprot/mL)、293T细胞(2×10^6个细胞，加样量0.1 mL，蛋白含量2.73 mgprot/mL)、A549细胞(2×10^6个细胞，加样量0.1 mL，蛋白含量0.67 mgprot/mL)中MDA含量(如下图)：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本和标准品显色很低	水浴时间太短	保证充足的水浴时间
	反应过程中反应管有水进入	用保鲜膜封 EP 管口并扎个小孔
样本测量结果偏大	上清液浑浊	取浑浊上清液再次离心直至澄清
样本测不出值	样本含量低于灵敏度	增加样本浓度
	样本保存时间过长或保存不当	取新鲜样本，重新检测

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。