

(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-K028-M

产品规格: 48T(44 samples)/96T(92 samples)

检测仪器: 酶标仪(530-540 nm)

Elabscience®丙二醛(MDA)比色法测试盒(测细胞)

Malondialdehyde (MDA) Colorimetric

Assay Kit (Cell Samples)

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。

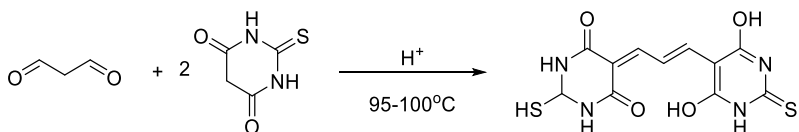
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

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 (Acid Reagent)	3 mL×1 瓶	6 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	显色剂 (Chromogenic Agent)	15 mL×1 瓶	30 mL×1 瓶	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)	提取剂 (Extracting Solution)	30 mL×1 瓶	60 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
	96 孔酶标板	1 板		
	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)、涡旋混匀仪、恒温水浴锅(100 ℃)、微量移液器(1000 μL，200 μL)、离心机、烧杯(50 mL)。

耗材：枪头(1000 μL，200 μL)、EP 管(1.5 mL)。

试剂：无水乙醇，双蒸水。

试剂准备

- ① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。
- ② 试剂一2-8℃存放时会凝固，使用前37℃加热，直到透明液体方可使用。
- ③ 试剂三若有析出，需在80℃加热溶解，冷却后使用。

④ 试剂二应用液的配制：

按试剂二：双蒸水= 1.2 : 34的比例进行配制，2-8 ℃保存3个月。

⑤ 工作液的配制：

按试剂一：试剂二应用液：试剂三= 0.2 : 3 : 1的比例进行配制，现配现用。

样本准备

① 样本处理

取不少于 3×10^6 个细胞，弃去细胞培养上清，用细胞刮将细胞刮下，用移液器将细胞转移到塑料离心管中，加试剂五提取液 0.5 mL，混匀 2 min，将细胞破碎(可用玻璃匀浆器手动匀浆或者超声破碎)制成悬液，待测。留取部分悬液，4℃， $10000 \times g$ 离心 10 min，取上清用于蛋白浓度的测定。

注：超声破碎：超声波破碎仪可选择参数 90 W，4 s/次，间隙 2 s，总时间 10 min。

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：0.29-100 nmol/mL，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数
A549 细胞	不稀释
HepG2 细胞	不稀释
293T 细胞	不稀释

注：稀释液为试剂五。

实验关键点

- ① 水浴反应 40 min 时温度要控制在 95-100 ℃。
- ② 吸取上清液到酶标板时，防止产生气泡。
- ③ 试剂三中若有析出，需 80℃水浴加热溶解后使用。

操作步骤

- ① 空白管：取 0.1 mL 无水乙醇，加入到 1.5 mL EP 管中。
标准管：取 0.1 mL 10 nmol/mL 标准品，加入到对应的 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①中各管加入 1 mL 工作液。
- ③ EP 管口用保鲜膜扎紧，充分混匀，并在保鲜膜上扎一个小孔，100 ℃ 水浴 40 min。
- ④ 流水冷却至室温，1078 ×g 离心 10 min。
- ⑤ 用微量移液器取上清液 0.25 mL 到酶标板。(不能将沉淀加入酶标板中)。
- 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
无水乙醇(mL)	0.1		
10 nmol/mL 标准品(mL)		0.1	
样本(mL)			0.1
工作液(mL)	1	1	1
EP 管口用保鲜膜扎紧，充分混匀，并在保鲜膜上扎一个小孔，100 ℃ 水浴 40 min，流水冷却至室温，1078 ×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:

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

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	0.29-100 nmol/mL	平均批间差	3.5 %
灵敏度	0.29 nmol/mL	平均批内差	3.3 %
平均回收率	95 %		

附录2 实例分析

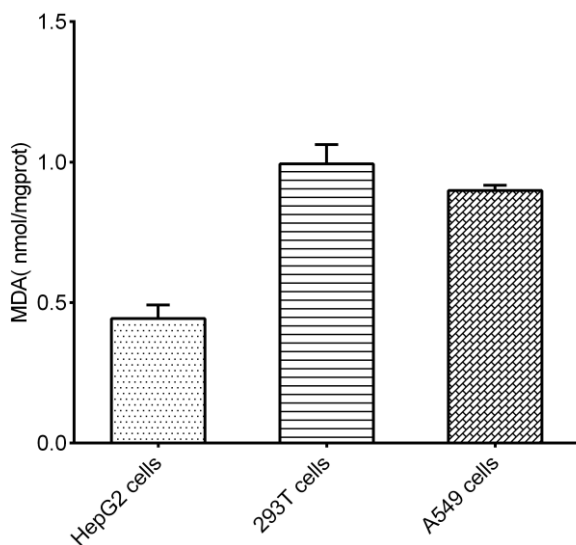
例如检测HepG2细胞(数据仅供参考):

取0.1 mL HepG2细胞悬液, 按操作表检测, 结果如下:

空白管OD值为0.043, 标准管OD值为0.211, 测定管OD值为0.068, 同时测得悬液蛋白浓度为3.38 mg/mL, 代入公式计算得:

$$\text{MDA 含量} = \frac{0.068-0.043}{0.211-0.043} \times 10 \div 3.38 = 0.44 \text{ nmol/mgprot}$$

按照说明书操作, 测定HepG2细胞(加样量0.1 mL, 蛋白含量3.38 mg/mL)、293T细胞(加样量0.1 mL, 蛋白含量2.73 mg/mL)、A549细胞(加样量0.1 mL, 蛋白含量0.67 mg/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。

附录4 客户发表文献

1. Du S, Zhou N, Xie G, et al. Surface-engineered triboelectric nanogenerator patches with drug loading and electrical stimulation capabilities: Toward promoting infected wounds healing[J]. *Nano Energy*, 2021, 85:106004. IF:17.087
2. Bartolini D, Arato I, Mancuso F, et al. Melatonin modulates Nrf2 activity to protect porcine pre-pubertal Sertoli cells from the abnormal H₂O₂ generation and reductive stress effects of cadmium. *J Pineal Res.* 2022;73 (1):e12806. IF:13.007
3. Yang Z, Wang J, Ai S, et al. Self-generating oxygen enhanced mitochondrion-targeted photodynamic therapy for tumor treatment with hypoxia scavenging[J]. *Theranostics*, 2019, 9(23): 6809. IF:11.556
4. Wan Q, Cao R, Wen G, et al. Sequential use of UV-LEDs irradiation and chlorine to disinfect waterborne fungal spores: Efficiency, mechanism and photoreactivation[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 423:127102-. IF:10.588
5. Tian J, Wang L, Hui S, et al. Cadmium accumulation regulated by a rice heavy-metal importer is harmful for host plant and leaf bacteria. *J Adv Res.* 2022. IF:10.479
6. Jg A, Jie S B, Jy B, et al. Comparative toxicity reduction potential of UV/sodium percarbonate and UV/hydrogen peroxide treatments for bisphenol A in water: An integrated analysis using chemical, computational, biological, and metabolomic approaches[J]. *Water Research*, 2020, 190. IF:9.702
7. Yang X X, Xu X, Wang M F, et al. A nanoreactor boosts chemodynamic therapy and ferroptosis for synergistic cancer therapy using molecular amplifier dihydroartemisinin[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2022, 20(1):1-19. IF:9.464
8. Liu Z, Liu X, Yang Q, et al. Neutrophil membrane-enveloped nanoparticles for the amelioration of renal ischemia-reperfusion injury in mice[J]. *Acta Biomaterialia*, 2020, 104: 158-166. IF:8.947
9. Huang S, Le H, Hong G, et al. An all-in-one biomimetic iron-small interfering RNA nanoplatfrom induces ferroptosis for cancer therapy. *Acta Biomater.* 2022;148:244-257. IF:8.291
10. Alharbi YM, Sakr SS, Albarrak SM, et al. Antioxidative, Antidiabetic, and Hypolipidemic Properties of Probiotic-Enriched Fermented Camel Milk Combined with *Salvia officinalis* Leaves Hydroalcoholic Extract in Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11 (4):. IF:7.675

11. Wang H, Huang Q, Zhang Z, et al. Transient post-operative overexpression of CXCR2 on monocytes of traumatic brain injury patients drives monocyte chemotaxis toward cerebrospinal fluid and enhances monocyte-mediated immunogenic cell death of neurons in vitro[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2022. IF:7.573
12. Liu P, Yin Z, Chen M, et al. Cytotoxicity of adducts formed between quercetin and methylglyoxal in PC-12 cells[J]. *Food Chemistry*, 2021, 352(2):129424. IF:7.514
13. Adhikari B, Adhikari M, Ghimire B, et al. Cold plasma seed priming modulates growth, redox homeostasis and stress response by inducing reactive species in tomato (*Solanum lycopersicum*)[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2020, 156: 57-69. IF:7.376
14. Zhao X, Wang C, Dai S, et al. Quercetin Protects Ethanol-Induced Hepatocyte Pyroptosis via Scavenging Mitochondrial ROS and Promoting PGC-1 α -Regulated Mitochondrial Homeostasis in L02 Cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:4591134. IF:7.31
15. Chagas TQ, Freitas ÍN, Montalvão MF, Nobrega RH, Machado MRF, Charlie-Silva I, Araújo APDC, Guimarães ATB, Alvarez TGDS, Malafaia G. Multiple endpoints of polylactic acid biomicroplastic toxicity in adult zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Chemosphere*. 2021 Aug;277:130279. IF:7.086
16. Mlindeli Gamede, Lindokuhle Mabuza, Phikelelani Ngubane, et al. Preventing the onset of diabetes-induced chronic kidney disease during prediabetes: The effects of oleanolic acid on selected markers of chronic kidney disease in a diet-induced prediabetic rat model[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021 Jul;139:111570. IF:6.529
17. Yang H, Zhu Y, Ye Y, et al. Nitric oxide protects against cochlear hair cell damage and noise-induced hearing loss through glucose metabolic reprogramming.[J]. *Free radical biology & medicine*, 2021. IF:6.525
18. Rao M J, Xu Y, Tang X, et al. CsCYT75B1, a Citrus CYTOCHROME P450 Gene, Is Involved in Accumulation of Antioxidant Flavonoids and Induces Drought Tolerance in Transgenic Arabidopsis[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2020, 9(2):161. IF:6.313
19. Liou G G, Hsieh C C, Lee Y J, et al. N-Acetyl Cysteine Overdose Inducing Hepatic Steatosis and Systemic Inflammation in Both Propacetamol-Induced Hepatotoxic and Normal Mice[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(3):442. IF:6.312
20. Wang Y, Chi H, Xu F, et al. Cadmium chloride-induced apoptosis of HK-2 cells via interfering with mitochondrial respiratory chain[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 236:113494-. IF:6.233
21. Obaid QA, Al-Shammari AM, Khudair KK. Glucose Deprivation Induced by Acarbose

- and Oncolytic Newcastle Disease Virus Promote Metabolic Oxidative Stress and Cell Death in a Breast Cancer Model. *Front Mol Biosci.* 2022;9:816510. IF:6.113
22. Abdel-Wahab BA, Walbi IA, Albarqi HA, Ali FEM, Hassanein EHM. Roflumilast protects from cisplatin-induced testicular toxicity in male rats and enhances its cytotoxicity in prostate cancer cell line. Role of NF- κ B-p65, cAMP/PKA and Nrf2/HO-1, NQO1 signaling[J]. *Food Chem Toxicol.* 2021 May;151:112133. IF:6.023
 23. Aljutaily T. Evaluating the Nutritional and Immune Potentiating Characteristics of Unfermented and Fermented Turmeric Camel Milk in Cyclophosphamide-Induced Immunosuppression in Rats. *Antioxidants (Basel).* 2022;11 (4):. IF:5.952
 24. Jabbari N, Nawaz M, Rezaie J. Ionizing Radiation Increases the Activity of Exosomal Secretory Pathway in MCF-7 Human Breast Cancer Cells: A Possible Way to Communicate Resistance against Radiotherapy[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(15):3649-. IF:5.923
 25. Shanmugarajan D, Girish C, Harivenkatesh N, et al. Antihypertensive and pleiotropic effects of *Phyllanthus emblica* extract as an add-on therapy in patients with essential hypertension—A randomized double-blind placebo-controlled trial[J]. *Phytotherapy Research*, 2021. IF:5.878
 26. Short-Chain Fatty Acid, Sodium Propionate, in Patients on Maintenance Hemodialysis: Beneficial Effects on Inflammatory Parameters and Gut-Derived Uremic Toxins, A Pilot Study (PLAN Study)[J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2018. IF:5.688
 27. Peng J, Pan J, Mo J, et al. MPO/HOCl Facilitates Apoptosis and Ferroptosis in the SOD1 G93A Motor Neuron of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Oxid Med Cell Longev.* 2022;2022:8217663. IF:5.604
 28. Treadmill Exercise Alleviates Brain Iron Dyshomeostasis Accelerating Neuronal Amyloid- β Production, Neuronal Cell Death, and Cognitive Impairment in Transgenic Mice Model of Alzheimer's Disease[J]. *Molecular neurobiology*, 2021, 58(7):3208-3223. IF:5.59
 29. Aboulhoda, B. E., Rashed, L. A., Ahmed, H., et al. Hydrogen sulfide and mesenchymal stem cells-extracted microvesicles attenuate LPS-induced Alzheimer's disease[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2021, 236(8):5994-6010 IF:5.546
 30. Liu W, Jia H, Guan M, et al. Discovery of novel tubulin inhibitors targeting the colchicine binding site via virtual screening, structural optimization and antitumor evaluation. *Bioorg Chem.* 2022;118:105486. IF:5.508