（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

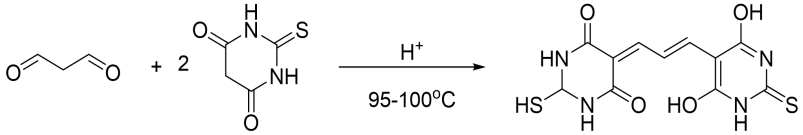
具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

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°C 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°C 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°C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°C 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°C 保存 6 个月
	96 孔酶标板	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)、涡旋混匀仪、恒温水浴锅(100°C)、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°C存放时会凝固，使用前37°C加热，直到透明液体方可使用。

③ 试剂三若有析出，需在80°C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°C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 × 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°C。

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°C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°C 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°C 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：

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

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	0.29-100 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

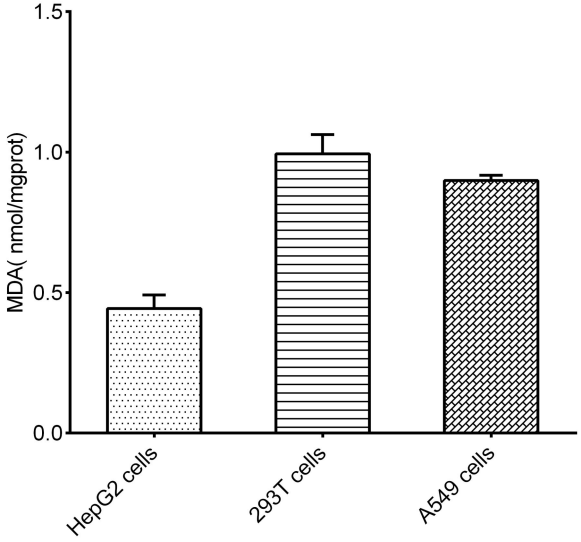
例如检测HepG2细胞(数据仅供参考)：

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：

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

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. Qiu C, Tang C, Tang Y, et al. RGS5+ lymphatic endothelial cells facilitate metastasis and acquired drug resistance of breast cancer through oxidative stress-sensing mechanism[J]. Drug Resistance Updates, 2024, 77: 101149.

2. Wang X, Wang J, Liu S, et al. Sterilization mechanism and nanotoxicity of visible light-driven defective carbon nitride and UV-excited TiO2[J]. Journal of Hazardous Materials, 2024, 461: 132109.

3. Wu Z, Chen K, Mo W, et al. Multimodal enhancement of ferroptosis for synergistic cascade colorectal cancer therapy[J]. Chemical Engineering Journal, 2024, 498: 155048.

4. Zhang H, Feng Y, Si Y, et al. Shank3 ameliorates neuronal injury after cerebral ischemia/reperfusion via inhibiting oxidative stress and inflammation[J]. Redox Biology, 2024, 69: 102983.

5. Zhang T, Wang S, Hua D, et al. Identification of ZIP8-induced ferroptosis as a major type of cell death in monocytes under sepsis conditions[J]. Redox Biology, 2024, 69: 102985.

6. Tian Y, Guo Z, et al. 17β-oestradiol inhibits ferroptosis in the hippocampus by upregulating DHODH and further improves memory decline after ovariectomy[J]. Redox Biology, 2023, 62: 102708.