

(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-F007

产品规格: 48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器: 荧光酶标仪(激发波长 520 nm, 发射波长 550 nm)

## Elabscience®丙二醛 (MDA) 荧光法测试盒

### Malondialdehyde (MDA) Fluorometric 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](mailto:biochemical@elabscience.cn)

网址: [www.elabscience.cn](http://www.elabscience.cn)

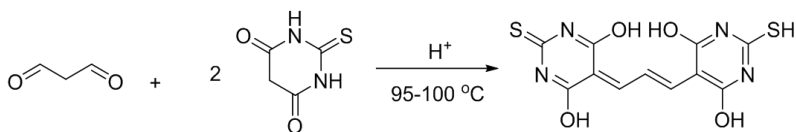
具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。  
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

## 用途

本试剂盒适用于检测血清（浆）、动物组织、细胞样本中的 MDA 含量。

## 检测原理

丙二醛（Malondialdehyde, MDA）是脂质过氧化物分解后形成的一种化合物，用于检测脂质氧化水平，该指标在氧化应激、铁死亡等领域的研究中被广泛使用。MDA 在酸性和高温环境下，可与硫代巴比妥酸（Thiobarbituric acid, TBA）缩合，生成 TBA 复合体，通过测定其荧光强度来检测样本中的 MDA。



本试剂盒在检测组织和细胞样本时，需要测定总蛋白浓度，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)	6 mL×1 瓶	12 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	酸试剂 (Acid Reagent)	2 mL×1 瓶	4 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	TBA 试剂 (TBA Reagent)	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	2-8℃ 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	20 μmol/L 标准品 (20 μmol/L Standard)	5 mL×1 瓶	5 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	CAMT 裂解液 (CAMT Lysis Buffer)	20 mL×1 瓶	40 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
	96 孔黑色酶标板	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：**荧光酶标仪（激发波长 520 nm，发射波长 550 nm）

**试剂：**冰乙酸、生理盐水（0.9% NaCl）或 PBS（0.01 M，pH 7.4）

## 试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温；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。

② 试剂二应用液的配制：

试剂二：双蒸水按 6：170 体积比例混匀即可，现配现用。

③ 试剂三应用液的配制：

取一瓶试剂三加入 10 mL 90-100℃ 的双蒸水中，搅拌溶解后加冰乙酸 10 mL，混匀，冷却至室温，2-8℃ 避光可保存 1 个月（冰乙酸自备）。

④ 显色剂的配制：

试剂二应用液：试剂三应用液按 3:1 的比例混匀即可，现配现用，24h 之内用完。

⑤ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度( $\mu\text{mol/L}$ )	0	0.5	1	2	4	6	8	10
20 $\mu\text{mol/L}$ 标准品( $\mu\text{L}$ )	0	25	50	100	200	300	400	500
双蒸水( $\mu\text{L}$ )	1000	975	950	900	800	700	600	500

## 样本准备

### ① 样本处理

血清血浆样本：直接进行测定。

组织样本：按照组织重量 (g) 与 PBS (0.01 M, pH 7.4) (或生理盐水 (0.9% NaCl)) (mL) = 1: 9 的比例进行匀浆, 4 ℃, 10000 ×g 离心 10 min, 取上清液置于冰盒上待测 (若离心后上清液中仍存在白色絮状物可多次离心, 直至上清液澄清), 留一部分上清液用于总蛋白浓度测定。

细胞样本:  $1 \times 10^6$ - $10^7$  个细胞加入 300 μL 试剂五。混匀后放置在冰盒上裂解 10 min, 每 5 min 混匀一次, 直接置于冰盒上待测, 留一部分用于总蛋白浓度测定。

### 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: 0.04-10 μmol/L, 可参考下表进行稀释(仅供参考):

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
人血清	2-4	人血浆	不稀释
大鼠血清	不稀释	大鼠血浆	不稀释
小鼠血清	2-4	小鼠血浆	不稀释
10%小鼠脑组织	不稀释	10%大鼠脑组织	不稀释
10%小鼠肝组织	不稀释	10%大鼠肾组织	2-4
$9.2 \times 10^6$ 个 CHO 细胞	不稀释		

注: 血清 (浆) 或组织样本稀释液为生理盐水 (0.9% NaCl) 或 PBS (0.01 M, pH 7.4); 细胞样本稀释液为试剂五。

## 实验关键点

- ① 水浴反应 40 min 时温度要控制在 95-100 ℃。
- ② 水浴反应中，不可直接盖紧 EP 管盖子，应在 EP 管口扎气孔。
- ③ 细胞样本裂解后不需要离心，直接置于冰盒上待测。
- ④ 细胞样本需做预实验确定适当的细胞用量。

## 操作步骤

- ① 标准管：取 0.1 mL 不同浓度的标准品，分别加入到 1.5 mL EP 管中；  
测定管：取 0.1 mL 待测样本，分别加入到 1.5 mL EP 管中。
- ② 向步骤①中的各管加入 0.1 mL 试剂一。
- ③ 向步骤②中各管加入 0.5 mL 的显色剂。
- ④ 充分混匀，在 EP 管口扎一个小气孔，95-100 ℃ 水浴 40 min。
- ⑥ 流水冷却至室温，10000 ×g 离心 10 min。
- ⑦ 取上清液 0.25 mL 到酶标板（请勿将沉淀加入酶标板中）。
- ⑧ 荧光酶标仪于激发波长 520 nm，发射波长 550 nm 下检测各孔荧光值。

## 操作表

	标准管	测定管
不同浓度的标准品(mL)	0.1	
待测样本(mL)		0.1
试剂一(mL)	0.1	0.1
显色剂(mL)	0.5	0.5
充分混匀，EP 管口扎一个小气孔，95-100 ℃ 水浴 40 min，流水冷却至室温，10000 ×g 离心 10 min。取上清液 0.25 mL 到酶标板。		
荧光酶标仪于激发波长 520 nm，发射波长 550 nm 下检测，测定各孔荧光值。		

本试剂盒检测组织或细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

## 结果计算

标准品拟合曲线:  $y = ax + b$

血清(浆)MDA含量的计算公式:

$$\text{MDA} \text{ (}\mu\text{mol/L)} = (\Delta F - b) \div a \times f$$

组织、细胞中MDA含量的计算公式:

$$\text{MDA} \text{ (}\mu\text{mol/gprot)} = (\Delta F - b) \div a \times f \div C_{\text{pr}}$$

注解:

y: 标准孔荧光值-空白孔荧光值(标准品浓度为0时的荧光值)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

$\Delta F$ : 待测样本的绝对荧光值(测定孔荧光值-空白孔荧光值)

f: 待测样本加入检测体系前的稀释倍数

$C_{\text{pr}}$ : 待测样本的蛋白浓度(gprot/L)

## 附录1 关键数据

### 1. 技术参数

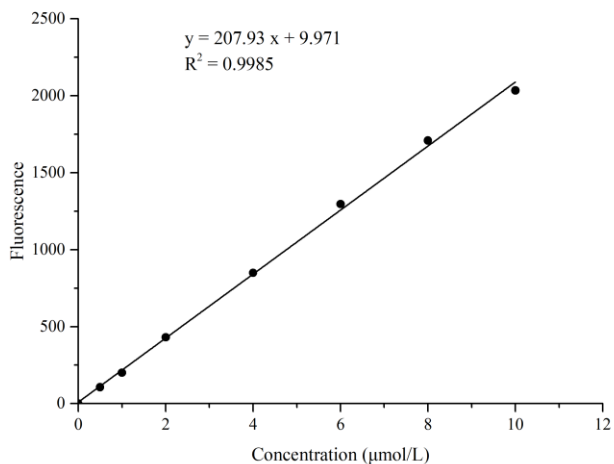
检测范围	0.04-10 $\mu\text{mol/L}$	批间差	4.5-7.0 %
灵敏度	0.04 $\mu\text{mol/L}$	批内差	2.3-4.3 %
回收率	95-99 %		

### 2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量0.1 mL，按照操作步骤进行实验，测定荧光值如下表所示：

标准品浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	0	0.5	1	2	4	6	8	10
荧光值	57	164	262	486	893	1339	1780	2105
	62	168	258	495	924	1373	1757	2083
平均荧光值	59	166	260	490	909	1356	1768	2094
绝对荧光值	0	107	201	431	850	1297	1709	2035

② 绘制标曲(如下图)：





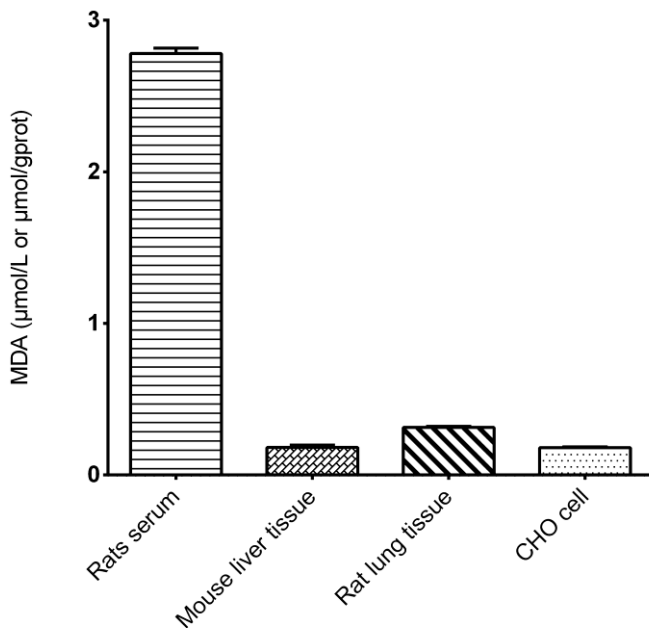
## 附录2 实例分析

例如检测小鼠肝脏组织(数据仅供参考):

取处理好的10%小鼠肝脏组织匀浆0.1 mL,按说明书操作表操作,结果如下:标准曲线:  $y = 207.93x + 9.971$ ,测定管平均荧光值为545.27,空白管平均荧光值为59.14,同时测得10%小鼠肝脏组织匀浆蛋白含量为12.59 gprot/L计算结果为:

$$\text{MDA } (\mu\text{mol/gprot}) = \frac{545.27 - 59.14 - 9.971}{207.93} \div 12.59 = 0.182 \mu\text{mol/gprot}$$

按照说明书操作,测定大鼠血清(稀释3倍,加样量0.1 mL)、小鼠肝脏组织(10%组织匀浆的蛋白浓度12.59 gprot/L,加样量0.1 mL)、大鼠肺组织(10%组织匀浆的蛋白浓度7.83 gprot/L,加样量0.1 mL)及CHO(9.2×10<sup>6</sup>个细胞匀浆蛋白浓度为7.24 gprot/L,CAMT细胞裂解液处理,加样量0.1 mL)中的MDA含量:



### 附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
测值不稳定，复孔差异大	微量移液器使用不熟练	注意加试剂一时，微量移液枪采用吸二档打一档法，避免产生气泡
	待测组织样本匀浆中存在絮状物	多次离心取上清
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
	水浴温度较低	严格控制水浴温度 95-100℃
样本测不出值	样本稀释倍数太大	选择合适稀释倍数，重新检测
	样本含量太低，低于灵敏度	增加取样量或者浓缩样本
	样本保存时间过长或者保存不当	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于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。



