

(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

网址: www.elabscience.cn

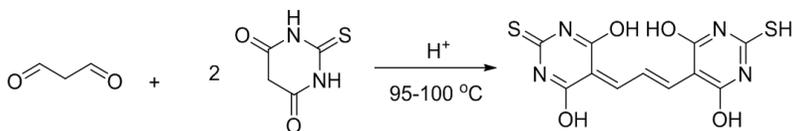
具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

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°C 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°C 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°C 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°C 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°C 保存 6 个月 |
| | 96 孔黑色酶标板 | 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：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，24 h 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(μmol/L) | 0 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| 20 μmol/L 标准品(μL) | 0 | 25 | 50 | 100 | 200 | 300 | 400 | 500 |
| 双蒸水(μL) | 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°C, 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: 1×10⁶-10⁷ 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 |
| 9.2×10 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°C。
- 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°C 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°C 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

ΔF : 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_{pr} : 待测样本的蛋白浓度 (gprot/L)

附录1 关键数据

1. 技术参数

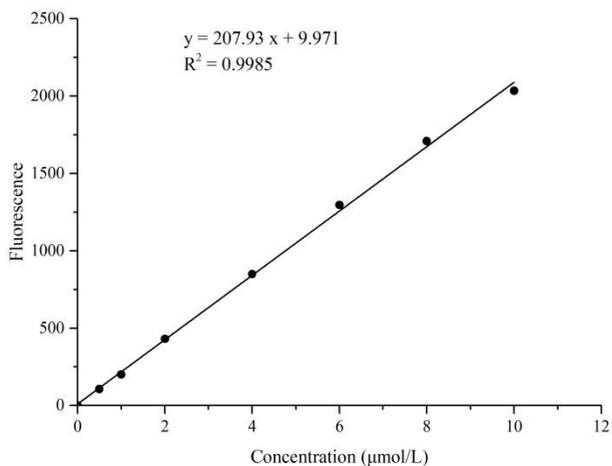
| | | | |
|------|---------------------------|-----|-----------|
| 检测范围 | 0.04-10 $\mu\text{mol/L}$ | 批间差 | 4.5-7.0 % |
| 灵敏度 | 0.04 $\mu\text{mol/L}$ | 批内差 | 2.3-4.3 % |
| 回收率 | 95-99 % | | |

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)：



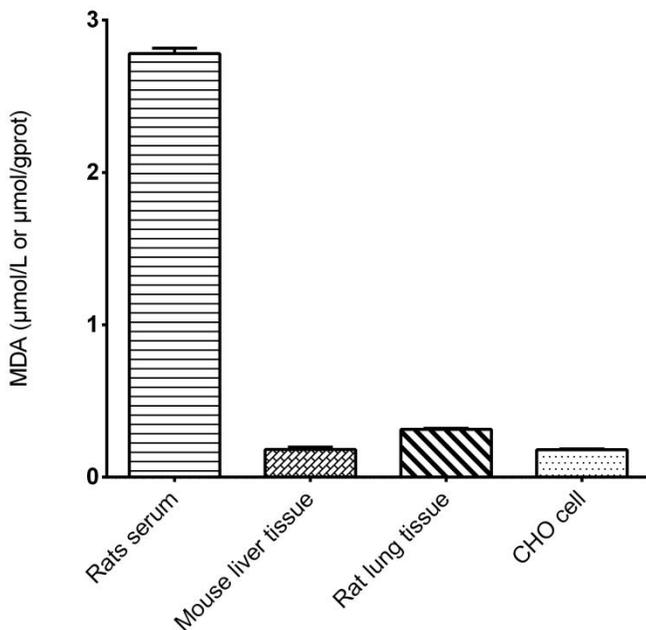
附录2 实例分析

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(9.2×10^6 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。

附录4 客户发表文献

1. Liang L, Peng W, Qin A, et al. Intracellularly synthesized artificial exosome treats acute lung injury[J]. ACS nano, 2024, 18(32): 21009-21023.
2. 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.
3. Wang Z, Yan C, Wang X, et al. Double-edged sword effects of sulfate reduction process in sulfur autotrophic denitrification system: Accelerating nitrogen removal and promoting antibiotic resistance genes spread[J]. Bioresource Technology, 2024, 409: 131239.
4. Nagareddy R, Kim J H, Kim J H, et al. Reactive Oxygen Species-Responsive Chitosan - Bilirubin Nanoparticles Loaded with Statin for Treatment of Cerebral Ischemia[J]. Biomaterials Research, 2024, 28: 0097.
5. Vijay K, Hasan M M, Sivaramakrishnan S, et al. Oleic acid empowers lipids and carotenoid overproduction from used engine oil effluent in *Chlorella vulgaris*[J]. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2024: 105827.

