

丙二醛(malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒微板法

使用说明书

产品货号: BP10468W

注意: 请在试剂盒保质期内使用, 具体保质期见外包装标签。

本产品仅供科学研究使用, 不能用于临床诊断。

检测范围: $2.5-40 \mu\text{mol/L}$

灵敏度: $2.5 \mu\text{mol/L}$

有效期: 6 个月

保存温度: $2-8^{\circ}\text{C}$

检测原理：

利用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）反应产生红色物质在 532nm 处有最大吸收峰。本试剂盒检测组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法。

注意事项：

1. 不能使用过期产品，不同货号 and 批号组分不得混用。
2. 本试剂开封后请尽快使用，以免空气、采样污染引起试剂变质。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 如果可能传播疾病，所有的样品都应管理好，按照规定的程序处理样品和检测装置。
5. 试剂严格按保存条件保存，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。试剂盒中如有提供粉剂，使用前请甩几下，使粉剂落入底部。

试剂盒组分：

试剂名称	规格（48T/40S）	规格（96T/88S）	保存条件
试剂一	2mL×1 瓶	4mL×1 瓶	2-8℃
试剂二	15mL×1 瓶	30mL×1 瓶	2-8℃
试剂三	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	2-8℃，避光
标准品(50 μ mol/L)	5mL×1 瓶	10mL×1 瓶	2-8℃，避光

所需仪器耗材及试剂：

离心机、酶标仪、可调式移液器、无水乙醇、水浴锅、PBS（0.01M，pH7.4）、冰乙酸。

样本处理及要求:

1. **试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围**, 建议实验前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定, 根据预实验的结果, 结合本试剂盒的线性范围: $2.5-40 \mu\text{mol/L}$, 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, 样本的稀释液为 PBS (0.01M , $\text{pH}7.4$)。
2. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中, 建议做预实验验证其检测有效性
3. **血清(浆)等液体样本**: 直接测定。若浑浊, 离心后取上清测定。
4. **组织样本**: 按照组织质量(g):PBS (0.01M , $\text{pH}7.4$) 体积(mL)为 1:5~10 的比例 (例如约 0.1g 组织, 加入 1mLPBS (0.01M , $\text{pH}7.4$)) 进行匀浆, 匀浆后, 4°C , 10000 g 离心 10min, 取上清置冰上待测。如需检测蛋白浓度, 可留取部分上清用于蛋白浓度测定。

细菌/细胞样本: 收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌/细胞数量 (10^4): PBS (0.01M , $\text{pH}7.4$) 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例(建议按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL、PBS (0.01M , $\text{pH}7.4$)), 超声波破碎细菌或细胞 (功率 200w, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次), 10000 g , 离心 10min, 取上清待测。

检测前准备工作:

1. 请提前取出试剂盒，平衡至室温。
2. **试剂三配置**：取 1 瓶试剂三，加 8.5mL 蒸馏水，盖上瓶盖水浴加热到 90℃~100℃ 充分溶解后，再加冰乙酸 8.5mL 混匀，冷却至室温，避光 2-8℃ 保存 1 个月（冰乙酸自备）。
3. **50%乙酸配制**：取 5mL 冰乙酸缓慢加入至 5mL 蒸馏水中，混匀，静置至室温待用（注：冰乙酸为高浓度酸，稀释过程需要缓慢加入）。
4. 试剂一低温时会凝固，检测前可 37℃ 加热以加速溶解，直至透明方可应用。
5. **标准工作液配置**：50 μmol/L 标准品按下表用对应量的无水乙醇稀释成以下浓度的标准品工作液：0 μmol/L、5 μmol/L、10 μmol/L、15 μmol/L、20 μmol/L、25 μmol/L、30 μmol/L、40 μmol/L。（注：配制目标浓度的标准品工作液时，每次请根据表格从标准品母液中取对应的体积与相应稀释液混合均匀后使用。）

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(μmol/L)	0	5	10	15	20	25	30	40
50 μmol/L 标准品(μL)	0	50	100	150	200	250	300	400
无水乙醇(μL)	500	450	400	350	300	250	200	100

也可根据实际样本来调整标准品浓度。按照标准管加样体系操作，依据结果即可制作标准曲线；本说明书中的标曲是用无水乙醇稀释得出，若选取其他稀释液可选择重做标曲。

操作步骤:

1. 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 532nm。
2. 加热水浴锅至 95℃ 以上。
3. 样本测定（在 EP 管中依次加入）：

试剂名称(μL)	标准管	测定管	对照管（选做）
样本		40	40
不同浓度标准品	40		
试剂一	40	40	40
试剂二	300	300	300
试剂三	300	300	
50%乙酸			300

混匀后，在 95° C 或沸水浴中保温 40min（注意防止爆盖，管口用封口膜封紧或使用防爆夹），取出放冰上冷却，25℃，12000rpm 离心 10min，取上清液 250 μL 至 96 孔板中，在 532nm 处读取各孔 OD 值。

注:

1. 水浴反应中，要注意防止爆盖（沸水浴 EP 管容易爆开，样本溅出或者蒸发，会导致检测结果不准确），可采用以下方式：①使用较大的螺旋盖的 EP 管。②不直接盖紧 EP 管，用保鲜膜封紧试管口并在保鲜膜上扎气孔。③使用防爆夹。
2. 若样本没有特殊颜色、浊度等因素，则对照管可以不测，用空白管来代替对照管。若样本有特殊颜色需要做对照管，本试剂盒 48T 检测 24 个样本，96T 检测 48 个样本。

实验结果结算：

1. 标准品拟合曲线： $y=ax+b$

2. 液体样本

(1) 样本按照体积计算公式： $MDA(\mu\text{ mol/L})=(\Delta A-b)\div a\times N$

(2) 按样本质量计算公式： $MDA(\mu\text{ mol/kg})=(\Delta A-b)\div a\times N\div (W\div V)$

(3) 按蛋白浓度计算公式： $MDA(\mu\text{ mol/gprot})=(\Delta A-b)\div a\times N\div C_{pr}$

(4) 按细胞数量计算公式： $MDA(\mu\text{ mol}/10^4)=(\Delta A-b)\div a\div 500\div V\times N$

注：

ΔA ：样本孔 OD 值-空白孔 OD 值 y ：标准孔 OD 值-空白孔 OD 值

（标准浓度为 0 时的 OD 值）

（标准浓度为 0 时的 OD 值）

x ：标准品的浓度

N ：样本稀释倍数

a ：标曲的斜率

W ：样品质量，g

b ：标曲的截距

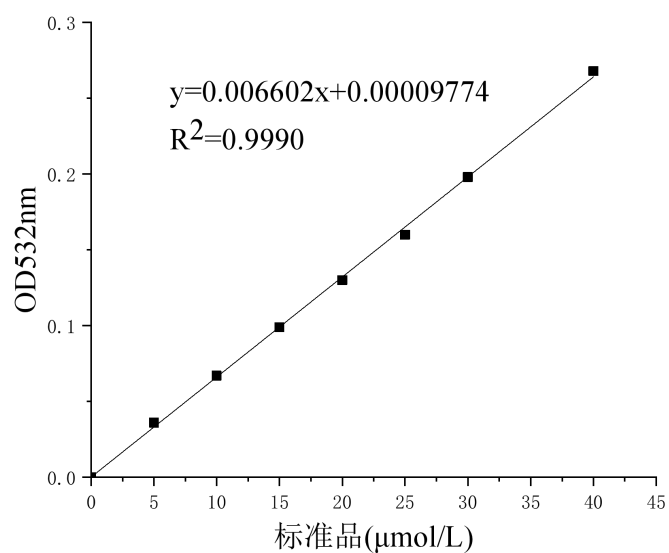
C_{pr} ：样本的蛋白浓度，mg/mL

V ：加入提取液体积，mL

500：细胞或细菌数量，万

参考曲线:

$y=0.006602x+0.00009774$, $R^2=0.9990$, x 是标准品的浓度($\mu\text{mol/L}$), y 是 ΔA 。



注意：本图仅供参考，应以每次实验数据所绘制标准曲线计算样本含量。