

CheKine™ Pro 丙二醛 (MDA) 含量检测试剂盒 (荧光法)

货号: KTB9050

规格: 48 T/48 S

96 T/96 S

批号: 见产品标签

	检测范围: 0.04-10 nmol/mL		灵敏度: 0.04 nmol/mL
	适用样本: 动植物组织、细胞、血清 (浆)		
	保质期: 4℃, 避光保存 6 个月		

01 背景与原理

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。

本试剂盒检测原理是 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。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Extraction Buffer I	60 mL	120 mL	4℃
Extraction Buffer II	24 mL	48 mL	4℃
Reagent I	300 µL	600 µL	4℃, 避光保存
Reagent II	52 mL	104 mL	4℃
Reagent III	36 mL	72 mL	4℃, 避光保存
Reagent IV	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4℃, 避光保存
Reagent V	20 mL	40 mL	4℃
Standard (4.05 mmol/mL)	400 µL	400 µL	4℃, 避光保存

*请在实验前检查各组分的量。

*各组分在规格基础上额外提供 10% 的量用于进行标准曲线制作或预实验。

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	荧光酶标仪	激发波长为 520 nm，发射波长为 550 nm
耗材	96 孔酶标板	全黑板
试剂	无水乙醇/去离子水/PBS	标准稀释用/试剂稀释用/样本清洗用
其他	匀浆器（组织样本）、低温离心机、水浴锅、制冰机、 可调式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有 助于提高实验效率

04 注意事项

- 正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 建议实验者自行建立标准曲线以提高结果准确度。如未自行建立标准曲线，可参考结果展示部分的典型标准曲线公式进行结果计算。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，请在实验全程做好生物安全防护，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

05-1-1 试剂准备

注意：各组分开盖前，请先低速离心。

试剂名称	试剂准备	注意事项
Extraction Buffer I	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Extraction Buffer II	即用型	实验过程中冰上放置；4℃保存
Reagent I	即用型；使用前平衡到室温	4℃避光保存；有刺激性气味，建议在通风橱进行实验。
Reagent II	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Reagent III	即用型；使用前平衡到室温	4℃避光保存；有刺激性气味，建议在通风橱进行实验。
Working Reagent IV	临用前配制；将 Reagent II 全部转移至 Reagent IV 中，充分溶解	实验过程中避光冰上放置；用不完的试剂-20℃分装避光保存 6 个月，禁止反复冻融；有刺激性气味，建议在通风橱进行实验。
Reagent V	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Standard (4.05 mmol/mL)	即用型；	实验过程中避光冰上放置；有刺激性气味，建议在通风橱进行实验。

05-1-2 标准品配制

取 20 μL 4.05 mmol/mL Standard, 加入 61 μL 无水乙醇混匀稀释, 即得 1 mmol/mL Standard; 取 20 μL 1 mmol/mL Standard, 加入 980 μL 无水乙醇混匀稀释, 即得 20 $\mu\text{mol/mL}$ Standard; 取 5 μL 20 $\mu\text{mol/mL}$ Standard, 加入 995 μL 去离子水混匀稀释, 即得 100 nmol/mL Standard。使用 100 nmol/mL Standard, 按照下表所示, 进一步稀释成标准品: 每次实验都要做一次标准品检测, 制作标曲; 稀释后的标准品溶液不稳定, 必须在 4 小时内使用。

序号	100 nmol/mL Standard (μL)	去离子水 (μL)	浓度 (nmol/mL)
1	100	900	10
2	80	920	8
3	60	940	6
4	40	960	4
5	20	980	2
6	10	990	1
7	5	995	0.5
空白	0	1000	0

05-2 样本制备

注意: 推荐使用新鲜样本。样本尽量新鲜提取, 如果不能当天提取, 则把完整细胞或者分装的组织块保存在 -80°C , 一个月内使用。测定时, 应控制解冻的温度和时间。室温环境下解冻时, 需在 4 h 内完成样品解冻。

- **动植物组织:** 称取约 0.1 g 样本, 加入 1 mL Extraction Buffer I, 冰浴匀浆, 10000 g, 4°C 离心 10 min, 取上清置冰上待测。
- **细胞:** 收集 5×10^6 个细胞, 用预冷的 PBS 清洗细胞, 800 g 离心 2 min, 弃上清。加入 0.4 mL 冷的 Extraction Buffer II, 混匀后放置在冰上裂解 5 min, 每 2 min 混匀一次, 直接置于冰上待测。
- **血清(浆)等液体样本:** 直接测定。

05-3 实验步骤

1. **酶标仪准备:** 荧光酶标仪预热 30 min 以上, 调节激发波长为 520 nm, 发射波长为 550 nm。
2. **工作液的配制:** 每个测定孔/空白孔/标准孔准备 600 μL Working Reagent I, 现配现用: 按照 Reagent III: Working Reagent IV=200 μL : 400 μL 的比例, 混合均匀。每个对照孔准备 600 μL Working Reagent II, 现配现用: 按照 Reagent III: Reagent V=200 μL : 400 μL 的比例, 混合均匀。
3. **检测体系配制:** 空白管和标准管只需做 1-2 次。如果样本不存在溶血、脂血现象, 则对照管可以不测, 用空白管来代替对照管。在 1.5 mL EP 管中按照如下方式操作:

试剂	测定管 (μL)	对照管 (μL)	空白管 (μL)	标准管 (μL)
样本	200	200	0	0
Standard	0	0	0	200
去离子水	0	0	200	0
Reagent I	2	2	2	2
Working Reagent I	600	0	600	600
Working Reagent II	0	600	0	0

4. 荧光检测：混匀后，95℃水浴反应 50 min，取出后流水冷却，10000 g，室温离心 10 min，取 200 μL 上清至 96 孔全黑板，记录各孔的荧光值 RFU，荧光激发波长 520 nm，荧光发射波长 550 nm，测定孔记为 RFU_{测定}，对照孔记为 RFU_{对照}，空白孔记为 RFU_{空白}，标准孔记为 RFU_{标准}。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧二维码或访问官网[\[https://www.abbkine.cn\]](https://www.abbkine.cn) > 进入“技术中心”> 查找“在线计算器”工具。



06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算 $\Delta RFU_{测定} = RFU_{测定} - RFU_{对照}$ ， $\Delta RFU_{标准} = RFU_{标准} - RFU_{空白}$

2. 标准曲线绘制

以标准溶液浓度为 y 轴， $\Delta RFU_{标准}$ 为 x 轴，绘制标准曲线，得到标准方程，将 $\Delta RFU_{测定}$ 带入方程得到 y (nmol/mL)。

3. 样本 MDA 计算

- 按样本蛋白浓度计算

$$MDA (nmol/mg \text{ prot}) = (y \times V_{样}) \div (V_{样} \times Cpr) \times n = y \div Cpr \times n$$

- 按样本鲜重计算：

$$MDA (nmol/g) = (y \times V_{样}) \div (V_{样} \div V_1 \times W) \times n = y \div W \times n$$

- 按照细胞数量计算

$$MDA (nmol/10^4 \text{ cell}) = (y \times V_{样}) \div (V_{样} \div V_2 \times N) \times n = 0.4y \div N \times n$$

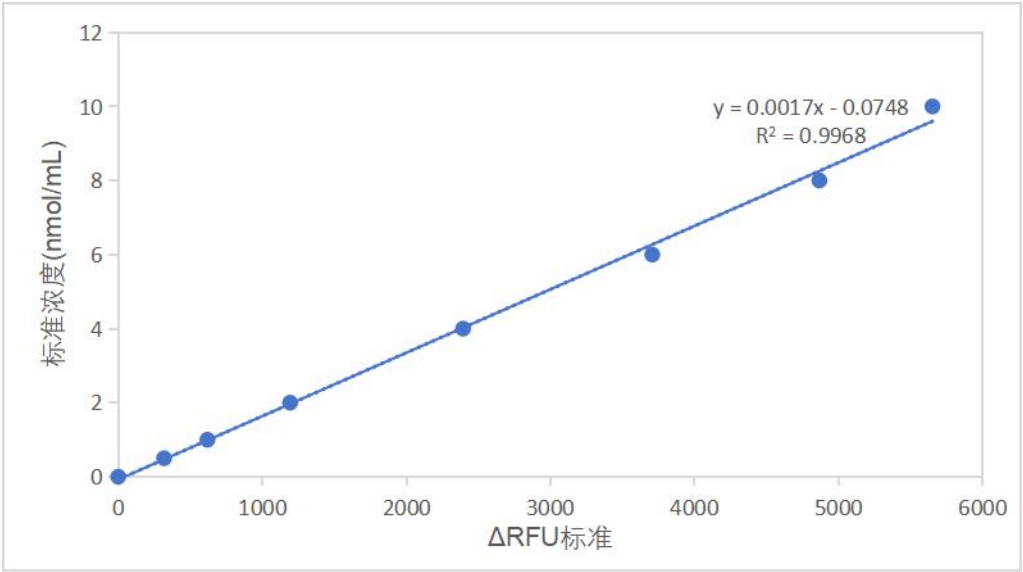
- 按样本体积计算：

$$MDA (nmol/mL) = (y \times V_{样}) \div V_{样} \times n = y \times n$$

$V_{样}$ ：加入反应体系中上清液体积，200 μL=0.2 mL； V_1 ：加入 Extraction Buffer I 体积，1 mL； V_2 ：加入 Extraction Buffer II 体积，0.4 mL；n：稀释倍数；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；N：细胞数量，以 10^4 为单位（例如细胞数量为 5×10^6 ，N=500）。

07 结果展示

典型标准曲线： $y=0.0017x-0.0748$ ， $R^2=0.9968$



示例-1: 取 0.094 g 兔肾脏，按照样本制备步骤操作，取上清稀释 5 倍，之后按照测定步骤操作，用全黑 96 孔板测得： $\Delta RFU_{测定} = RFU_{测定} - RFU_{对照} = 3989 - 71 = 3918$ ，代入标准曲线，计算 $y = 6.5858$ 。按样本质量计算得： $MDA (nmol/g) = y \div W \times n = 350.31 \text{ nmol/g}$

08 FAQ

● 检测得到的样本 $\Delta RFU_{测定}$ 过高或者过低怎么办？
实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本稀释成不同浓度做预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.04-10 nmol/mL，选择合适的稀释倍数对样本进行检测。如果待测组织样本匀浆中存在絮状物，可多次离心取上清，避免测值不稳定，复孔差异大。如果 $RFU_{测定}$ 较低或 $\Delta RFU_{测定}$ 为负值，可适当增加样本量或延长反应时间，但不得超过 100 min。如果样本测不出值，建议取新鲜样本，重新检测。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB9300	CheKine™ Pro 葡萄糖含量检测试剂盒（荧光法）
KTB9041	CheKine™ Pro 过氧化氢（H ₂ O ₂ ）含量检测试剂盒（荧光法）
KTB9042	CheKine™ Pro 过氧化氢酶（CAT）活性检测试剂盒（荧光法）

CheKine™ Pro 丙二醛 (MDA) 含量检测流程示意图

(Abbkin 货号：KTB9050)

