

## 硫代巴比妥酸反应物 (TBARS) 检测试剂盒 (50T)

## 一般说明

脂质过氧化是由氧化损伤造成的脂质降解，是氧化应激的重要标志。多不饱和脂质通常易受活性氧的氧化攻击，引起明确的链反应并生成最终产物，如丙二醛 (MDA)。脂质过氧化影响许多疾病的病理，包括动脉粥样硬化、糖尿病和阿尔茨海默氏病。本试剂盒通过 MDA 与硫代巴比妥酸 (TBA) 反应形成的比色 (535 nm) / 荧光 ( $\lambda_{ex} = 560 / \lambda_{em} = 585\text{nm}$ ) 产物测定脂质过氧化，产物与存在的 MDA 成比例关系。检测范围，比色法 1 - 30  $\mu\text{M}$ ，荧光法 0.1 - 1.5  $\mu\text{M}$  MDA。

## 产品应用

适于测定组织、细胞和血浆等各类样品中的丙二醛 (MDA)。

## 试剂盒组成与保存

TBARS 试剂: 12 mL	-20° C 保存
标准品: 50 $\mu\text{L}$	-20° C 保存
10% TCA: 12 mL	-20° C 保存

## 样品准备

如果不即时检测，样品可在 -80°C 冷冻保存一个月。尿液和唾液样本，可直接检测 ( $n = 1$ )。下面的样品在检测前需要去蛋白：

(1) 血清、血浆：将 100  $\mu\text{L}$  样品转移到一个标记好的 1.5 mL 离心管。组织和细胞样品：向约 20 mg 样品或  $5 \times 10^6$  细胞加入 200  $\mu\text{L}$  含蛋白酶抑制剂的冰冷 PBS，在 40 伏特下超声粉碎 20 秒。如果需要，移除 20  $\mu\text{L}$  作蛋白分析。将 100  $\mu\text{L}$  裂解液放置到另一个 1.5 mL 离心管中。

(2) 将 200  $\mu\text{L}$  冰冷的 10% TCA (三氯乙酸) 加到到每个 100  $\mu\text{L}$  样品中，摇匀，在冰上放置 15 分钟。

(3) 在 14,000 rpm 离心 5 分钟。转移 200  $\mu\text{L}$  上清液到另一个已标记好的离心管。这些预处理的样品的稀释因子是  $n = 3$ ；

## 比色法测试步骤：

将水浴或加热孔板温度调节到 100°C。所有试剂放置至室温。向 15 mM 标准品管加入 450  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$ ，混合得到 1.5 mM MDA 标准品。未使用的标准液储存在 -20°C 供以后使用。

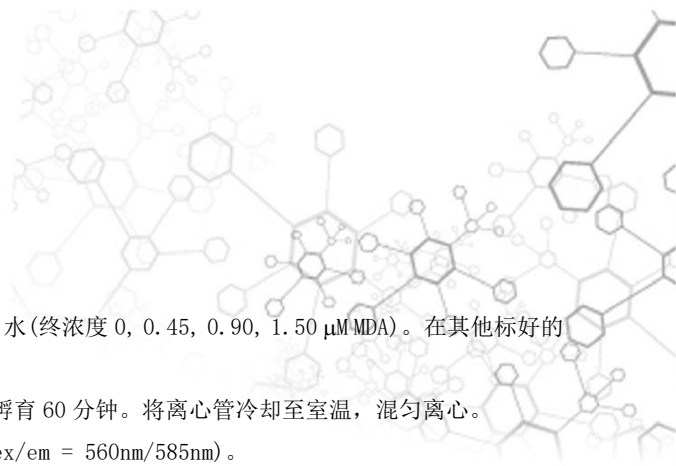
(1) 标准液：将 15  $\mu\text{L}$  1.5 mM MDA 与 735  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$  混合，得到 30  $\mu\text{M}$  MDA。按照下表稀释标准液。分别转移 200  $\mu\text{L}$  标准液到一个标好的 1.5 mL 离心管。

标号	30 $\mu\text{M}$ MDA + $\text{H}_2\text{O}$	$\mu\text{L}$	MDA ( $\mu\text{M}$ )
1	300 $\mu\text{L}$ + 0 $\mu\text{L}$	300	30
2	180 $\mu\text{L}$ + 120 $\mu\text{L}$	300	18
3	90 $\mu\text{L}$ + 210 $\mu\text{L}$	300	9
4	0 $\mu\text{L}$ + 300 $\mu\text{L}$	300	0

样品：转移 200  $\mu\text{L}$  样品到其它标准液到一个标好的离心管。

(2) 显色反应：向标准液和样本中添加 200  $\mu\text{L}$  TBA 试剂，混匀后，在 100°C 下孵育 60 分钟。将离心管冷却至室温，混匀离心。(3) 从上述离心管取出 100  $\mu\text{L}$  上清液，加至平底透明 96-孔板中，在 535 nm 处读吸光度。





TBA050

### 荧光法测试步骤

- (1) 按比色皿法准备标准液。转移 10 $\mu$ L 标准液到标好的离心管中，再加 190 $\mu$ L 水(终浓度 0, 0.45, 0.90, 1.50  $\mu$ M MDA)。在其他标好的离心管中加入 200  $\mu$ L 处理好的样品。
- (2) 显色反应：向标准液和样本中添加 200 $\mu$ L TBA 试剂，混匀后，在 100 $^{\circ}$ C 下孵育 60 分钟。将离心管冷却至室温，混匀离心。
- (3) 从上述离心管取出 100 $\mu$ L 上清液，加至黑色 96-孔板中，读取荧光强度( $\lambda_{ex}/em = 560nm/585nm$ )。

### 浓度计算

所有标准品和样品吸光值减去空白对照的吸光值或荧光强度，对标准浓度作图并确定标准曲线的斜率(Slope)，计算样品 TBARS 的浓度

$$[\text{TBARS}] = \frac{R_{\text{样本}} - R_{\text{空白}}}{\text{Slope} (\mu\text{M}^{-1})} \times n \quad (\mu\text{M MDA equivalents})$$

$R_{\text{样本}}$ 和  $R_{\text{空白}}$ 分别代表样品和水的OD<sub>535nm</sub>值或荧光强度； $n$ 是稀释系数(去蛋白样品  $n = 3$ )。

注意：如果计算出TBARS的浓度高于30  $\mu$ M MDA(比色皿法)或者1.5 $\mu$ M MDA(荧光法)，用水稀释样品重新测试，乘以稀释倍数。

**注意事项：**本产品仅供研究用，使用过程中严格遵循实验安全措施。

