

脂质过氧化物（LPO）含量检测试剂盒说明书

可见分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：AC17836

规格：50T/48S

产品内容：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 20mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×2 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 7mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体 1mL×1 支	2-8℃保存
稀释液	液体 20mL×1 瓶	2-8℃保存

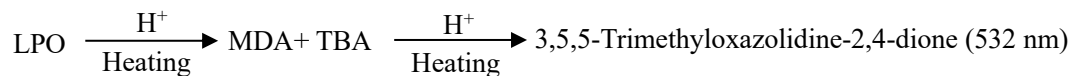
溶液的配制：

1. 试剂二：临用前取 1 瓶试剂二加入 14mL 蒸馏水，此试剂较难溶，可以 70℃加热并剧烈振荡以促进溶解，或者通过超声处理以促进溶解。每次用前需检查是否有粉剂析出。用不完的试剂可在 2-8℃中保存一个月。
2. 标准品：为 1000nmol/mL 的标准溶液。

产品说明：

脂质过氧化物（lipid hydroperoxide LPO）是不饱和脂肪酸链经自由基或活性氧作用后产生的过氧化物。病理情况下，脂质过氧化反应增强可导致原本低含量的 LPO 升高。LPO 含量升高会对细胞的结构和功能造成损伤，LPO 含量与机体免疫系统和衰老密切相关。

LPO 在酸性条件下加热产生丙二醛（MDA），MDA 与硫代巴比妥酸(Thiobarbituric acid, TBA)缩合，生成棕红色物质三甲川(3,5,5-三甲基恶唑-2,4-二酮)，其最大吸收波长在 532nm，进行比色后可估测样本中 LPO 的含量。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、1mL 玻璃比色皿、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1、组织：按照样本质量（g）：提取液体积（mL）为 1:5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液）加入提取液，冰浴匀浆；8000g 4℃离心 10min，取上清置冰上待测。

2、细菌或细胞样本：收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清，按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为 500~1000:1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液）加入提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 7s，总时间 3min），8000g 4℃离心 10min，取上清置冰上待测。

3、培养液或其他液体：直接检测。若溶液浑浊则离心后取上清进行测定。

二、测定步骤

1、可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 532 和 600nm，用蒸馏水调零。

2、标准溶液的制备：现标准液为 1000nmol/mL 的 MDA 标准溶液，将标准液用 **稀释液** 稀释至 20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625 nmol/mL 备用，具体稀释可参考下表。

序号	稀释前浓度 (nmol/mL)	标准液体积 (μ L)	稀释液体积 (μ L)	稀释后浓度 (nmol/mL)
1	1000	40	960	40
2	40	500	500	20
3	20	500	500	10
4	10	500	500	5
5	5	500	500	2.5
6	2.5	500	500	1.25
7	1.25	500	500	0.625
8	0.625	500	500	0.3125
9	0.3125	500	500	0.15625

备注：实验中每个标准管需 400 μ L 标准溶液。

3、在 EP 管中按下表步骤加样：

试剂名称	测定管	对照管	标准管	空白管
样本 (μ L)	400	-	-	-
蒸馏水 (μ L)	-	400	-	-
标准液 (μ L)	-	-	400	-
稀释液 (μ L)	-	-	-	400
试剂一 (μ L)	300	300	300	300
试剂二 (μ L)	200	200	200	200
试剂三 (μ L)	100	100	100	100

将混合液在 45℃（植物样本）或 100℃（其他样本）水浴 60min 后（标准管在两个温度水浴均可），置于冰浴中冷却，8000g，常温，离心 10min。吸取 900 μ L 上清液于 1mL 玻璃比色皿中，测定各样本在 532nm 和 600nm 处的吸光度。分别计算 $\Delta A = (A_{532 \text{ 测定}} - A_{532 \text{ 对照}}) - (A_{600 \text{ 测定}} - A_{600 \text{ 对照}})$ ， $\Delta A \text{ 标准} = (A_{532 \text{ 标准}} - A_{532 \text{ 空白}}) - (A_{600 \text{ 标准}} - A_{600 \text{ 空白}})$ （标准曲线，空白管和对照管只需做 1-2 次）。

（上述反应混合液煮沸时，务必避免液体溅出，时刻注意安全。使用普通扣盖 EP 管可以用封口膜缠口后，使用针头在盖子上扎一小孔防止爆盖，更推荐使用带有螺旋口的 EP 管（也需缠膜），若使用金属浴加热也可用重物压紧管盖。）

二、LPO 含量的计算

1. 根据标准管的浓度（x，nmol/mL）和吸光度 ΔA 标准（y， ΔA 标准），建立标准曲线。根据标准曲线，将 ΔA （y， ΔA ）代入公式计算样本浓度（x，nmol/mL）

2. 按样本蛋白质浓度计算

$$\text{LPO 含量 (nmol/mg prot)} = x \times V_{\text{样}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) = x \div \text{Cpr}$$

3. 按样本质量计算

$$\text{LPO 含量 (nmol/g 质量)} = x \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) = x \div W$$

4. 按细菌/细胞数量计算

$$\text{LPO 含量 (nmol/10}^4\text{cell)} = x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量 (万个)}) = x \div \text{细胞数量 (万个)}$$

5. 按照液体样本体积计算

$$\text{LPO 含量 (nmol/mL)} = x$$

V 样: 加入样本体积, 0.4mL, V 样总: 提取液体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g。

注意事项:

1. 待测液如果有密集小气泡, 建议静置 20min 左右等待气泡消失再测, 以免影响测定结果, 如果有少量气泡可以通过低速离心或轻磕等方式来消除。
2. 待测液如果尚未澄清, 可吸取上清液后再次离心。
3. 为防止水浴 60min 过程中水分散失, 建议使用螺旋管或用封口膜给 EP 管缠口。
4. 如果用高温助溶试剂二, 需要待其冷却至室温后再使用。
5. 如果测定吸光值过低或接近空白, 适当延长反应时间或加大样本量后, 重新测定。如果吸光值过大或超过检测范围 ($A_{532} > 1.5$ 或者 $\Delta A > 1.5$ 时), 建议将样本适当稀释后进行测定。注意同步修改计算公式。

实验实例:

1. 称取 0.1192 g 绿萝叶片, 按照测定步骤操作, 测得计算 $A_{532 \text{ 测定}} = 0.143$, $A_{532 \text{ 对照}} = 0.005$, $A_{600 \text{ 测定}} = 0.023$, $A_{600 \text{ 对照}} = 0.004$, $\Delta A = 0.119$, 将 ΔA 代入标曲公式 $y = 0.0289x + 0.0032$, $R^2 = 0.9993$, 计算得 $x = 4.007$, 按样本质量计算得:
 $\text{LPO 含量 (nmol/g 质量)} = x \div W = 33.616 \text{ nmol/g 质量}$ 。
2. 称取 0.1209g 大鼠心脏, 按照测定步骤操作, 测得计算 $A_{532 \text{ 测定}} = 0.122$, $A_{532 \text{ 对照}} = 0.008$, $A_{600 \text{ 测定}} = 0.051$, $A_{600 \text{ 对照}} = 0.003$, $\Delta A = 0.066$, 将 ΔA 代入标曲公式 $y = 0.0838x + 0.0045$, $R^2 = 0.9989$, 得出 $x = 0.734$, 按样本质量计算得:
 $\text{LPO 含量 (nmol/g 质量)} = x \div W = 6.071 \text{ nmol/g 质量}$ 。

参考文献:

Hiroshi Ohkawa, Nobuko Ohishi, Kunio Yagi, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction[J], Analytical Biochemistry, 1979.

相关系列产品:

- AC10105/AC10106 过氧化氢酶 (CAT) 活性检测试剂盒
- AC10083/AC10084 过氧化物酶 (POD) 活性检测试剂盒
- AC10103/AC10104 多酚氧化酶 (PPO) 活性检测试剂盒
- AC10107/AC10108 苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活性检测试剂盒