

LPO (lipid peroxidation, LPO) 含量试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

脂质过氧化是动植物体内活性氧(ROS)氧化生物膜的过程, 脂质过氧化物 (LPO) 是脂质过氧化过程的产物, 即 ROS 与生物膜的磷脂、酶和膜受体相关的多不饱和脂肪酸的侧链及核酸等大分子物质起脂质过氧化反应形成 LPO, 使细胞膜的流动性和通透性发生改变, 最终导致细胞结构和功能的改变。因此, LPO 常被作为机体氧化应激的一种指标, 与某些疾病的病理过程, 如肿瘤、化学中毒、感染、炎症、自身免疫疾病、动脉粥样硬化 (AS) 及心脑血管疾病, 以及衰老等生理过程密切相关。

测定原理:

LPO 在酸性条件下加热, 产生小分子终产物 MDA, MDA 与硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA)缩合, 生成红色产物, 在 535nm 有最大吸收峰。

需自备的仪器和用品:

分光光度计、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配置:

提取液: 液体 60mL×1 瓶, 4°C 保存;

试剂一: 液体 48mL×1 瓶, 4°C 保存;

试剂二: 液体 18mL×1 瓶, 4°C 保存。

注意事项:

临用前注意试剂二是否完全溶解, 如未溶解, 可以 70°C-90°C 加热, 并振荡以促进溶解。

LPO 提取:

1、细菌、细胞或组织样品的制备:

细菌或培养细胞: 先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), 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 8000g 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

组织: 按照组织质量 (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), 进行冰浴匀浆。8000g 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2、血清 (浆) 样品: 直接检测。

测定步骤:

1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长到 535 nm, 蒸馏水调零。

2、在 EP 管中依次加入如下试剂

	测定管	空白管
试剂一 (μL)	900	900
样本 (μL)	90	
蒸馏水 (μL)		90
试剂二 (μL)	300	300

立即混匀, 95°C 水浴 40min 后, 流水冷却。3000g 离心 10min, 吸取 1mL 上清加入 1mL 玻璃比色皿, 测定 535nm 下各管吸光值, 记作 A 测定和 A 空白。ΔA=A 测定-A 空白。

LPO 含量计算:

用玻璃比色皿的计算公式如下

$y = 1.1446x - 0.0076$, $R^2 = 0.9997$, x 为标准品浓度 $\mu\text{mol/mL}$, y 为吸光度。

1、血清（浆）中 LPO 含量的计算:

$$\begin{aligned} \text{LPO 含量}(\text{nmol/mL}) &= (\Delta A + 0.0076) \div 1.1446 \times V_{\text{标}} \div V_{\text{样}} \times 1000 \\ &= 873.6 \times (\Delta A + 0.0076) \end{aligned}$$

2、细菌、细胞或动物组织中 LPO 含量计算

(1) 按照蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{LPO 含量}(\text{nmol/mg prot}) &= (\Delta A + 0.0076) \div 1.1446 \times V_{\text{标}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \times 1000 \\ &= 873.6 \times (\Delta A + 0.0076) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

需要另外测定, 建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

(2) 按照样品质量计算

$$\begin{aligned} \text{LPO 含量}(\text{nmol/g 鲜重}) &= (\Delta A + 0.0076) \div 1.1446 \times V_{\text{标}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times 1000 \\ &= 873.6 \times (\Delta A + 0.0076) \div W \end{aligned}$$

(3) 按照细菌或细胞密度计算:

$$\begin{aligned} \text{LPO 含量}(\text{nmol}/10^4) &= (\Delta A + 0.0076) \div 1.1446 \times V_{\text{标}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times 1000 \\ &= 1.747 \times (\Delta A + 0.0076) \end{aligned}$$

$V_{\text{标}}$: 标准曲线中加入标品体积, 0.06mL; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.06mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 mL; Cpr : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500 万; 1000, μmol 到 nmol 换算系数。
