

滴巴斯® TBARS®

丙二醛脂質過氧化定量分析檢測組使用說明

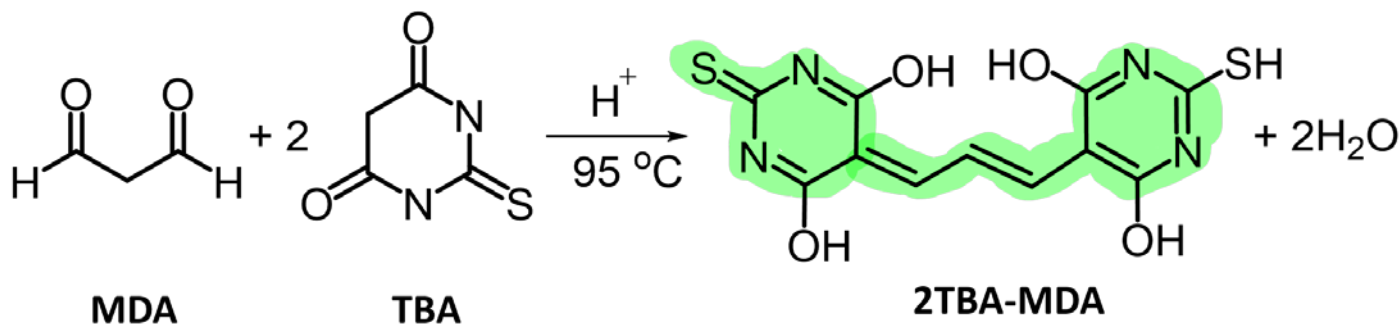
Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay Kit
Product Information

快速使用指引

1. 存放條件：在 4 °C 冷藏下避光存放。正常存放條件下，本產品可存放逾一年。
2. 樣品(標準品)、澄清劑與呈色劑之建議體積比：100 µL : 100 µL : 800 µL。
3. 反應溫度與時間：95 °C / 一小時。
4. 離心後，將上清液轉移到透明 96 孔盤，測量 OD 530 nm 強度。或是：
5. 將上清液轉移到黑色 96 孔盤後，以 530 nm 光源激發，測量 550 nm 螢光強度。

一、產品簡介

丙二醛(Malondialdehyde, MDA)是脂質過氧化反應後的天然代謝物。脂質過氧化反應是動植物細胞損傷後的機制，被認為是細胞和組織氧化壓力的指標之一。含多元不飽和脂肪酸(PUFA)的脂質，在過氧化反應後，會分解形成一系列複雜的化合物，其中包括活性羰基化合物，MDA。如下圖一，以硫代巴比妥酸(Thiobarbituric Acid, TBA)與MDA反應，來測量MDA含量的分析方法，是一種相當成熟的技術，許多研究人員對此Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS)分析方式進行了改進，用於評估多種類型的樣品，包括人體和動物組織、體液、藥物和食品。儘管文獻中關於TBA是否對MDA以外的化合物，亦具有反應性的問題，仍然存在爭議(TBA對MDA是否有專一性?)，但TBARS的方法仍然是測定脂質過氧化程度最廣泛使用的檢測方法。如果先用酸沉澱法(如本套組中所使用之沉澱劑，試劑E)，將樣品中的蛋白沉澱出來，則可最大限度地減少非來自於MDA的訊號干擾，從而使檢測結果具有很高的專一性。此外，若您的ELISA reader具有螢光檢測功能，我們建議您使用螢光方式檢測，因為螢光訊號較靈敏，同時，如下圖一所示，2TBA-MDA反應後的產物，具有特殊的長鏈共軛基團(綠色反白)，能發出特有的螢光訊號，使的螢光訊號更具有代表性(Toxicol Res. 2014 Mar;30(1):7-11.)。



圖一、TBARS 反應式

二、產品內容、運送與儲存：

名稱	說明	100 tests	運送	儲存
試劑 A	呈色劑粉末	紅標棕塑膠尖底離心管 X1	4 °C、避光	4 °C、避光
試劑 B	酸化劑	50 mL 紅標半透明塑膠瓶 X1		
試劑 C	中和劑	50 mL 藍標半透明塑膠瓶 X1		
試劑 D	MDA 標準液	200 μM, 3 mL 白標棕玻璃瓶 X1		
試劑 E	澄清劑	綠標透明玻璃瓶 X1		
樣品管	1.5 mL 螺蓋尖底半透明樣品管 X35 pc			

三、 產品使用步驟：

1. 未提供實驗材料：

- 1.1 可見光吸收(吸收波長為 530 nm)或是有螢光功能 Excitation 波長為 530 nm · Emission 波長為 550 nm 的 ELISA reader。
- 1.2 體積可調式移液管。
- 1.3 ddH₂O。
- 1.4 1.5 mL 離心管相容之管架(可用薄保麗龍板自行挖洞取代)。
- 1.5 水浴鍋或是 1.5 mL 離心管相容之乾浴加熱器 (95 °C/1 Hour)。
- 1.6 1.5 mL 離心管相容之離心機(2,000 x *g* · 4°C)。

2. 開始實驗：

2.1 樣品前處理：

2.1.1 血漿：一般而言，人類血漿測量 MDA 濃度，大約在 0.26-3.94 μM。

- A. 收集全血，可使用抗凝血劑，如肝素(heparin)、EDTA 或是檸檬酸。
- B. 在 4°C 下，以 1000 x *g* 離心 10 分鐘。將上層血漿層轉移至產品所附之乾淨 1.5 mL 離心管中，注意不要擾動到下層。將血漿樣品置於冰上保存。如果不是當天檢測，請冷凍於-80 °C。血漿樣品在-80 °C 可穩定保存一個月。應避免反覆凍融。
- C. 血漿樣品可以直接進行分析，不需要進一步稀釋。

2.1.2 血清：一般而言，人類血清測量 MDA 濃度，大約在 0.23-3.94 μM。

- A. 避免使用抗凝血劑，收集全血。
- B. 在 25°C 下，將血液靜置 30 分鐘，使血液凝結。
- C. 將血液在 4 °C 下以 2,000 x *g* 離心 15 分鐘。將上層血清轉移至產品所附之乾淨 1.5 mL 離心管中，注意不要擾動到下層。將血清置於冰上保存。如果不是當天檢測，請冷凍於-80 °C。血清樣品在-80 °C 可穩定保存一個月。應避免反覆凍融。
- D. 血清樣品可以直接進行分析，不需要進一步稀釋。

2.1.3 尿液：一般而言，人類尿液測量 MDA 濃度，大約在 2.8 μM (以螢光方式測量)。

- A. 無菌條件下收集當天早起的第一次尿液 (中段尿液)，直接排入無菌容器中。在 4 °C 下，以 1000 x *g* 離心 10 分鐘，取上清液轉移至產品所附之乾淨 1.5 mL 離心管中，注意不要擾動到下層，立即進行分析，或分裝後保存於≤-80 °C。避免反覆凍融。
- B. 尿液樣品可以直接進行分析，不需要進一步稀釋。

2.1.4 組織均質液：

- A. 將組織切取秤重約 25 mg，放入乾淨的 1.5 mL 離心管中。
- B. 加入 250 μL RIPA 緩衝液，其中含有所選的蛋白酶抑制劑 (請參閱第 4 節中的「干擾物質」)。
- C. 在冰上對組織進行均質處理或超音波處理。
- D. 將離心管在 4 °C 下以 1,600 x *g* 離心 10 分鐘。取上清液轉移至產品所附之乾淨 1.5 mL 離心管中，注意不要擾動到下層。將上清液置於冰上保存，立刻進行分析。若當天不進行分析，請冷凍於-80 °C。樣品可穩定保存一個月。避免反覆凍融。
- E. 請記得使用相同的 RIPA 緩衝液，作為接下來分析試驗之空白實驗。
- F. 組織均質液樣品可以直接進行分析，不需要進一步稀釋。

2.1.5 細胞裂解液：

- A. 收集 1 mL，細胞濃度約在 2×10^7 的細胞懸浮液。

- B. 加入 250 μL RIPA 緩衝液，其中含有所選的蛋白酶抑制劑（請參閱第 4 節中的「干擾物質」）
- C. 在冰上對細胞液進行均質處理或超音波裂解處理。
- D. 將離心管在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 2,000 $\times g$ 離心 10 分鐘。取上清液轉移至產品所附之乾淨 1.5 mL 離心管中，注意不要擾動到下層。將上清液置於冰上保存，立刻進行分析。若當天不進行分析，請冷凍於 -80 $^{\circ}\text{C}$ 。樣品可穩定保存一個月。避免反覆凍融。
- E. 請記得使用細胞懸浮液中的培養液與 RIPA 緩衝液，作為接下來分析試驗之空白實驗。
- F. 細胞裂解液樣品可以直接進行分析，不需要進一步稀釋。

2.2 實驗前試劑配置：

2.2.1 呈色劑配置：以下配置方式可測試 24 個樣品(含標準品)，可視需要，等比例調整配置量：

- A. 秤取 106 毫克呈色劑粉末（試劑 A），加入裝有 10 毫升酸化劑(試劑 B)的 50 mL 塑膠離心管中，震盪使其混合均勻。分數次加入中和劑(試劑 C)，每次體積約為 2 mL，使最後總加入試劑 C 的體積為 10 mL，震盪使 TBA 完全溶解，配置成 20 mL 呈色劑，此體積足夠 24 個樣品測量，使用者可依需求，等比例配置。雖然此呈色劑可在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下，穩定保存 24 小時，我們仍建議您當天配置，並儘速使用完。

2.2.2 標準液配置：

請參考下表，配置 0~50 μM 的 MDA 標準液：

編號	添加試劑	添加量 (μL)	ddH ₂ O 添加量 (μL)	最後 MDA 濃度 (μM)	最後 MDA 體積 (μL)
1	試劑 D (200 μM)	80	240	50	320
2	試劑 D (200 μM)	40	280	25	320
3	試劑 D (200 μM)	35	665	10	700
4	編號 3 (10 μM)	160	160	5	320
5	編號 3 (10 μM)	80	240	2.5	320
6	編號 3 (10 μM)	40	280	1.25	320
7	編號 3 (10 μM)	20	300	0.625	320
8	--	--	320	0	320

2.3 開始分析實驗：

2.3.1 請使用本產品附贈的 1.5 mL 螺蓋樣品管，標示樣品與標準品號碼。

注意：若您自行使用 1.5 mL 尖底連蓋樣品管(PP 材質)，請注意在步驟 2.3.6，加熱呈色步驟前，使用管口夾將管口夾緊，以避免加熱時爆管，使水分逸失，測量失準。

2.3.2 加入 100 μL 樣品或是標準品水溶液。

2.3.3 加入 100 μL 澄清劑(試劑 E)。

2.3.4 加入 800 μL 步驟 2.2.1 所配置之呈色劑。

2.3.5 鎖緊管蓋。

2.3.6 將樣品管置於管架(或是自製的挖洞保麗龍板)中，維持樣品管直立，置入 95 $^{\circ}\text{C}$ 加熱水浴鍋(或與樣品管相容之乾浴加熱器)中，加熱 1 小時。

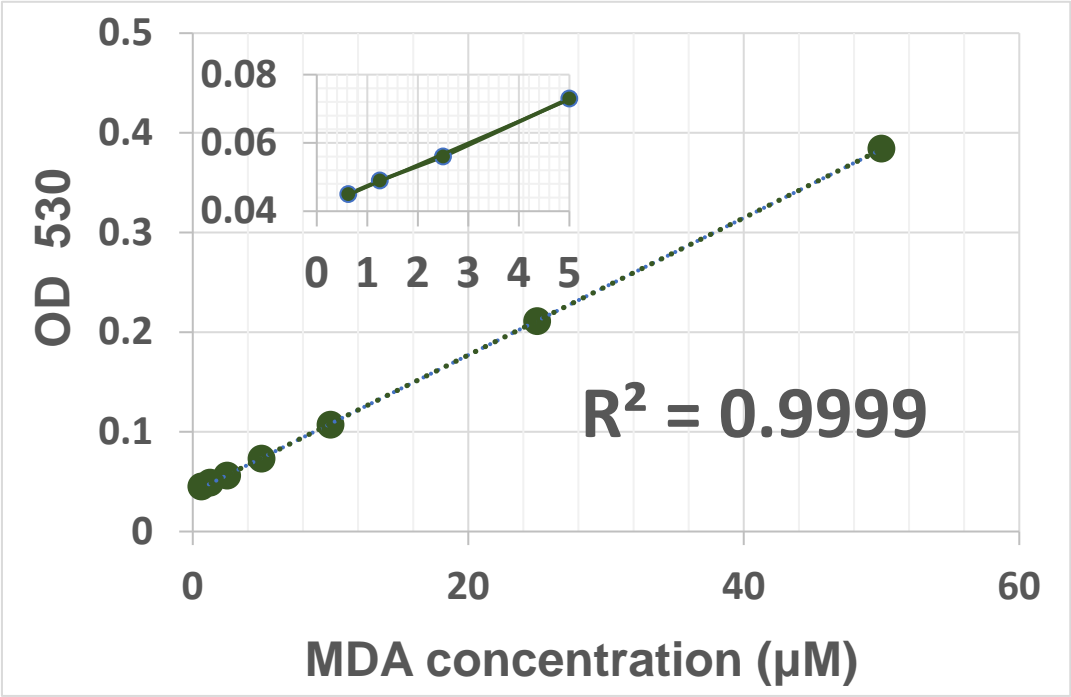
注意：請隨時注意加熱過程中，是否有爆管的情況，尤其是使用非本產品所附之樣品管。

2.3.7 將樣品管與管架移出水浴鍋，樣品管插於冰上冷卻十分鐘，以停止呈色反應。

2.3.8 在 4 $^{\circ}\text{C}$ ，1600 $\times g$ 下，離心十分鐘。

- 2.3.9 將樣品置於室溫下靜置 30 分鐘。
- 2.3.10 每個樣品管取出 200 μ L 上清液，轉置於 96 孔盤孔內。若是使用可見光 ELISA Reader，可使用一般無表面處理之透明孔盤。若是使用具螢光功能的 ELISA Reader，請使用黑色 96 孔盤。
- 2.3.11 可見光偵測波長設定為 530 nm；若使用螢光模式偵測，請設定激發光源 (Excitation) 波長為 530 nm，測量放光螢光 (Emission) 波長為 550 nm，波寬設為 10 nm。

四、 本產品實測結果：



圖二、本產品實測結果。內插圖表示低濃度實測結果。

五、 干擾物質表：

分類	物質	是否影響檢測 (Yes / No)
界面活性劑	Triton X-100 ($\leq 1\%$)	N
	Polysorbate 20 ($\leq 1\%$)	N
	CHAPS ($\leq 1\%$)	N
蛋白抑制劑 / 螯合劑	Chymostatin ($\leq 10 \mu\text{g/ml}$)	N
	Leupeptin ($\leq 10 \mu\text{g/ml}$)	N
	Antipain ($\leq 0.1 \text{ mg/ml}$)	N
	EGTA ($\leq 1 \text{ mM}$)	N
	EDTA ($\leq 1 \text{ mM}$)	N
	PMSF ($\leq 200 \mu\text{M}$)	N
	Trypsin ($\leq 10 \mu\text{g/ml}$)	N
緩衝溶液	Tris (25 mM)	N
	HEPES (100 mM)	N
	Borate (50 mM)	N
	Phosphate (100 mM)	N

含羥基物質	Glycerol ($\leq 10\%$)	N
	BHT (0.005%)	N
	BHT (0.01%)	Y
	Sucrose (250 mM)	Y

六、問題與解決方式：

問題	可能原因	解決方式
檢測結果數值異常：或是，三重複數值變異很大。	A. 使用移液裝置不當，或是移液裝置異常。 B. 孔盤的孔槽內，有氣泡殘留。 C. 光譜儀波寬設定太大。	A. 請更換正常的移液裝置，並委請有經驗的人員操作移液裝置。 B. 輕敲孔盤邊緣，或是用細針碰觸液面氣泡，以消除氣泡。 C. 將光譜儀波寬設定在 10 nm 以下，重新測量。
無訊號	A. 樣品中無 MDA，或是 MDA 濃度過低。 B. 樣品稀釋比例過高。	A. 觀察標準品是否有顏色改變(變粉紅色)，光譜儀檢測數值是否正常。若標準品顏色變化與數值正常，表示藥劑與配置方式是正常的。 B. 增加樣品濃度(細胞濃度提高、增加組織萃取量或是，降低樣品稀釋比例)。
螢光強度太強	螢光光譜儀中的“GAIN”值設定太高。	將螢光光譜儀維持波寬為 10 nm，降低 GAIN 值。

聚創新材料股份有限公司

IMT FORMOSA New Materials Co., Ltd.

電話 Phone: 0926-159317

電郵 Email: polycreatives@outlook.com

聯絡人 Contact: Peter Hsu

