

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-F003

产品规格: 96T

检测仪器: 荧光酶标仪, 流式细胞仪, 荧光显微镜

## Elabscience®脂质过氧化物(LPO)荧光法测试盒

### Lipid Peroxide (LPO) Fluorometric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题, 请通过以下方式联系我们:

电话: 400-999-2100

邮箱: [biochemical@elabscience.cn](mailto:biochemical@elabscience.cn)

网址: [www.elabscience.cn](http://www.elabscience.cn)

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签), 以便我们更高效地为您服务。

## 用途

本试剂盒适用于检测细胞中脂质过氧化物(LPO)的水平。

## 检测原理

脂质过氧化物(LPO)是不饱和脂肪酸经过活性氧的作用所生成的物质。生成的 LPO 会继续氧化脂质体,从而在连锁反应中不断积累 LPO。过量的 LPO 会分解成 Acrolein, Malondialdehyde (MDA), 4-hydroxy-2-nonenal (4-NHE)等具有高活性的醛类物质,对细胞产生毒性进而造成细胞死亡。

本试剂盒提供一种可以检测 LPO 形成的荧光探针 C11-BODIPY 581/591。这种荧光探针可以与脂质过氧化途径中的脂质自由基等发生反应,从而起到检测细胞内脂质过氧化水平的作用。该荧光探针在正常情况下通过光激发发出红色荧光,随着脂质过氧化的过程荧光会从红色变为绿色。通过绿色荧光强度的增强,可以高灵敏度的检测 LPO 的形成。

## 提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer)	50 mL×2 瓶	-20°C 保存 3 个月
试剂二 (Reagent 2)	5 mmol/L 探针 (5 mmol/L Probe)	0.05 mL×1 支	-20°C 避光 保存 3 个月
试剂三 (Reagent 3)	100 mmol/L 阳性对照 (100 mmol/L Positive Control)	0.1 mL×1 支	-20°C 避光 保存 3 个月
	96 孔黑色酶标板	1 板	
	96 孔覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 张	

说明: 试剂严格按上表中的保存条件保存, 不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂, 使用前请先离心, 以免量取不到足够量的试剂。

## 所需自备物品

仪器：荧光酶标仪、流式细胞仪和荧光显微镜

## 试剂准备

① 各试剂平衡至室温，试剂二可分装后-20℃避光保存，避免反复冻融。

② 试剂一工作液的配制：

按照试剂一：双蒸水=1:9的比例稀释得到试剂一工作液。（试剂一工作液可使用无血清培养基代替）

③ 试剂二工作液的配制：

试剂二使用试剂一工作液稀释到所需浓度得到试剂二工作液，推荐的浓度为2-5  $\mu\text{mol/L}$ 左右，可根据实验效果进行调整。现配现用，避光备用，2 h内使用有效。

④ 试剂三工作液的配制：

试剂三使用试剂一工作液稀释到所需浓度得到试剂三工作液，推荐使用的浓度为10-200  $\mu\text{mol/L}$ 左右。现配现用，避光备用，2 h内使用有效。

## 实验关键点

① 若使用试剂一工作液进行细胞洗涤和孵育，需要在实验前配制足量的试剂一工作液。

② 试剂二避免反复冻融，使用前注意需要充分融解后使用，变成液体状态后离心直至液体都到管底部再开盖，试剂二工作液建议现用现配。

③ 生成的荧光物质容易淬灭，孵育完成后最好在2 h之内进行测定，防止荧光减弱。

## 操作步骤

### 操作过程:

检测仪器部分参数设置	
绿色荧光(探针反应后的荧光)	
荧光酶标仪	Excitation: 500 nm; Emission: 540 nm
流式细胞仪	可以用 FITC 的参数设置检测
荧光显微镜	FITC 或 GFP

- ① 根据实验设计进行细胞培养, 将  $2 \times 10^5$  个细胞接种至板孔中, 培养细胞, 确保细胞健康且不会过度生长。
- ② 悬浮细胞: 将细胞转移至 2 mL EP 管中,  $300 \times g$  离心 5 min 后除去培养基, 用试剂一工作液洗涤细胞 2-3 次。贴壁细胞: 除去培养基, 用试剂一工作液洗涤细胞 2-3 次。
- ③ 设置空白组 (只有正常细胞), 对照组 (只有正常细胞, 并装载探针), 实验组 (细胞装载探针并经药物处理) 和阳性对照组 (可选做, 细胞装载探针并经试剂三工作液处理)。
- ④ 空白组加入试剂一工作液。对照组, 阳性对照组和实验组装载探针, 根据细胞培养容器选择适当的工作液体积。2 mL EP 管中, 通常每  $2 \times 10^5$  个细胞加入 200-500  $\mu\text{L}$  试剂二工作液, 推荐试剂二工作液的浓度为 2-5  $\mu\text{mol/L}$ 。37°C, 避光孵育细胞 30-60 min。(此过程孵育时间长短与细胞类型、荧光探针浓度有关, **各组加入液体体积保持一致**)
- ⑤ 用试剂一工作液洗涤细胞 2-3 次, 以充分去除未进入细胞内的探针。
- ⑥ 空白组和对照组加入试剂一工作液。实验组药物处理过程: 根据自身实验需求选择合适的药物处理条件。阳性刺激过程: 阳性对照使用试剂三工作液进行刺激处理, 根据细胞培养容器选择适当的试剂三工作液体积。2 mL EP 管中, 通常每  $2 \times 10^5$  个细胞加入 200-500  $\mu\text{L}$  试剂三工作液, 推荐试剂三工作液的浓度为 10-200  $\mu\text{mol/L}$ , 刺激时间为 30-60 min。(此过程孵育时间长短与细胞类型、药物浓度和阳性刺激浓度有关, **各组加入液体体积保持一致**)。

⑦ 用试剂一工作液洗涤细胞 2-3 次，以充分去除实验组多余的药物和阳性刺激组多余的试剂三工作液。

⑧ 检测：每管悬浮细胞需要再次加入 100-200  $\mu\text{L}$  试剂一工作液重悬细胞，转移至检测载体中并用于检测。贴壁细胞可以直接装载载玻片进行检测。

注：实验过程也可以先进行药物处理和阳性刺激，再装载探针。整个实验过程中，可用无血清培养液代替试剂一工作液。

## 声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。





