

EZ-Lipid peroxidation(TBARS)

Assay Kit

Oxidative Stress Assay Kit

Cat. No. DG-TBA200

FOR RESEARCH USE ONLY.

NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

▪ Product Description

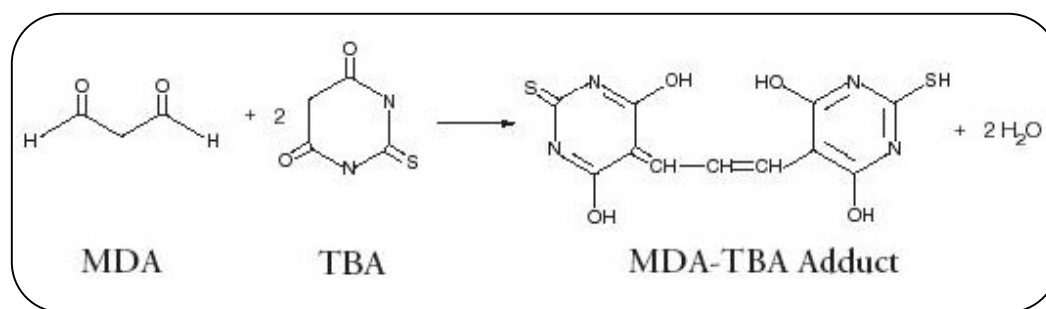
Lipid peroxidation은 동, 식물에서 잘 알려진 세포손상 (cellular damage) 메카니즘으로 cell과 tissue에서 산화적 스트레스 (oxidative stress)의 indicator로서 사용됩니다.

Lipid peroxidation_과정에 의해 막 지질이 파괴되고 과산화 지질이 생성되는데 이 과산화 지질은 매우 불안정하여 reactive carbonyl compound와 같은 복잡한 화합물들로 분해됩니다.

이후 다중 불포화 지방산의 과산화물은 Malonaldehyde (Malondialdehyde, MDA) 와 같은 물질로 분해되는데 이는 과산화 지질의 대표적인 marker로 이용됩니다.

Thiobarbituric Acid Reactive Substance (TBARS)의 측정은 잘 알려진 lipid peroxidation screen 방법으로, MDA가 thiobarbituric Acid (TBA)와 반응하여 형성하는 MDA-TBA Adduct를 측정함으로써 lipid peroxidation 정도를 알 수 있습니다.

이 분석은 25°C에서의 MDA와 발색 시약인 TBA의 반응에 기초하며, 산성 조건 하에서 MDA와 TBA의 반응에 의해 형성된 MDA-TBA adduct는 colorimetric 방법으로 흡광도540 nm (530 ~ 540 nm)에서 측정합니다. (Detection limit: 1.0 µM.)



MDA와 TBA의 반응으로 MDA-TBA Adduct의 형성

▪ Kit Contents and Storage Conditions

Component	200 assay	Storage
Indicator	2 vial	4 °C, 2개월
Acid reagent	20 ml x 2	4 °C, 2개월
100X BHT	100 µl	4 °C, 2개월
MDA standard (10 mM)	100 µl	4 °C, 2개월

* 본 제품은 연구 목적으로만 사용되어야 하며, 인체용 또는 진단을 목적으로 사용되어서는 안됩니다.

* 본 제품으로 수행할 수 있는 test 수에 있어서 200 assays라 함은 96 well plate 1 well을 기준으로 200개의 well을 처리할 수 있는 시약을 제공한다는 의미입니다. 이 중 standard, blank, sample 당 duplication 처리 등을 고려하면 실제 테스트 가능한 시료의 숫자는 50 samples 보다 적을 수 있습니다. 제품설명서를 자세히 검토하고, 테스트하고자 하는 sample의 특성을 고려하여 소요되는 키트의 수를 결정하십시오.

▪ Preparation of Reagent

Solution	Preparation	Storage and Stability
Indicator solution	Acid Reagent 10mℓ 과 indicator 1 vial을 섞어 stirring 하면서 hot plate (~80°C)에 녹여줍니다. Indicator가 다 녹은 후 상온에서 cool down 하여 사용합니다.	녹인 Indicator Solution은 4°C에서 7일 동안 보관이 가능하며 침전물이 생겼을 경우 물 중탕으로 녹인 후 상온에서 cool down 하여 사용합니다.

* Acid Reagent는 상온에 1시간 이상 두지 마십시오.

* indicator solution 준비 후, 상온에서도 주변 온도가 낮을 경우 침전물이 생길 수 있습니다.

* MDA Standard stock은 사용하기 직전에 준비하며 24시간 안에 사용합니다.

▪ General Protocol

1. Standard preparation

- 10 mM MDA Standard 20 $\mu\text{ℓ}$ 와 dH₂O 9.98 mL를 혼합하여 20 μM MDA Standard Stock을 만들어 줍니다. Micro tubes에 아래와 같이 solution을 넣어 MAD standard를 준비합니다.

Standard No.	Volume of 20 μM MDA Standard	Volume of dH ₂ O	Final standard volume in tube	Final standard MDA Conc. (μM)
0	0 $\mu\text{ℓ}$	200 $\mu\text{ℓ}$	200 $\mu\text{ℓ}$	0
1	5 $\mu\text{ℓ}$	195 $\mu\text{ℓ}$	200 $\mu\text{ℓ}$	0.5
2	10 $\mu\text{ℓ}$	190 $\mu\text{ℓ}$	200 $\mu\text{ℓ}$	1.0
3	25 $\mu\text{ℓ}$	175 $\mu\text{ℓ}$	200 $\mu\text{ℓ}$	2.5
4	50 $\mu\text{ℓ}$	150 $\mu\text{ℓ}$	200 $\mu\text{ℓ}$	5
5	100 $\mu\text{ℓ}$	100 $\mu\text{ℓ}$	200 $\mu\text{ℓ}$	10
6	150 $\mu\text{ℓ}$	50 $\mu\text{ℓ}$	200 $\mu\text{ℓ}$	15
7	200 $\mu\text{ℓ}$	0 $\mu\text{ℓ}$	200 $\mu\text{ℓ}$	20

* Standard는 실험 시 마다 측정하는 것이 좋습니다.

2. Sample preparation

- 모든 sample의 과산화 지질들이 실험 과정에 걸쳐서 안정적으로 유지될 수 있도록 sample의 온도를 낮게 유지합니다.

- Sample을 재 냉동하지 마시고, Photo oxidation을 방지하기 위해 빛을 차단한 상태로 보관하십시오
- Urine sample은 바로 사용할 수 있지만 불용성의 particle을 제거하기 위해 centrifuge 하여 상층액만 사용합니다. 채취 후 가능한 빠른 시간 내에 분석을 수행하십시오. 24 시간 이내라도 신뢰 있는 데이터를 얻을 수 있습니다. 만약 분석을 다른 날에 진행한다면, -70°C에 보관합니다.
- Plasma or Serum은 희석하지 않고 바로 분석해도 됩니다. Deproteinization 처리 후 분석하고자 할 때는 다음 과정을 수행하거나 10KD spin column을 사용하십시오.
 - ① 포화 ammonium sulfate 100 μl 를 plasma or serum sample 0.5 ml 에 첨가합니다.
 - ② TCA 35 mg을 각 sample에 첨가한 후 vortexing하면, 뿌연 침전물 상태가 됩니다.
 - ③ Centrifuge를 하고 상층액만 분석을 진행합니다.
- Tissue or Cell
 - ① Hemoglobin이 실험에 영향을 줄 수도 있으므로 heparin이 포함된 PBS로 perfusion 합니다.
 - ② 1X BHT가 포함된 PBS를 넣습니다.
 - Tissue : 50 to 100 mg/ml in PBS containing 1X BHT
 - Cell : $1-2 \times 10^7$ cells/ml in PBS containing 1X BHT
 - ③ Tissue or cell sample을 얼음에서 균질화 (homogenization) 합니다.
 - ④ Centrifuge를 하고 상층액만 분석을 진행합니다.

Free MDA 측정 시 protocol

1. Micro tubes에 다음과 같이 준비하십시오.
 - 1) Standards : standard 200 μl 에 Indicator Solution 200 μl 첨가
 - 2) Samples : sample 200 μl 에 Indicator Solution 200 μl 첨가
 - 3) Blank(중요, 생략하지 마십시오) : sample 200 μl 에 Acid Reagent 200 μl 첨가.
2. 상온에서 45분 동안 반응시킵니다.
3. Microplate에 150 μl 씩 분주한 후 plate reader 를 이용하여 540 nm 에서 흡광도를 측정합니다.

Total MDA 측정 시 protocol

1. Micro tubes에 다음과 같이 준비하십시오.
 - 1) Standards: standard 200 μ l에 Indicator Solution 200 μ l 첨가
 - 2) Samples: sample 200 μ l에 Indicator Solution 200 μ l 첨가
 - 3) Blank(중요, 생략하지 마십시오): sample 200 μ l에 Acid Reagent 200 μ l 첨가.
2. 65°C 에서 45분 동안 반응시킵니다.
3. Microplate에 150 μ l씩 분주한 후 Plate reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정합니다.

▪ Calculation

1. 모든 측정 값에서 blank의 OD 값을 빼줍니다.
2. 각 standard well과 sample well, Blank well 의 duplicate 측정값을 평균합니다.
3. MDA standard 흡광도를 이용하여 standard curve를 그려줍니다.
(MDA standard concentration Vs OD_{540nm})
4. 표준곡선에 의해 나타낸 선형 방정식을 이용하여 각 시료에 대한 MDA의 농도를 계산합니다. 샘플을 희석하였다면 최종 결과값은 샘플 희석배율을 곱해주어야 합니다. Serum 또는 Plasma samples의 경우, 만약 위의 방법대로 단백질 제거를 수행한 경우는 희석배수 1.2를 추가로 적용 합니다.

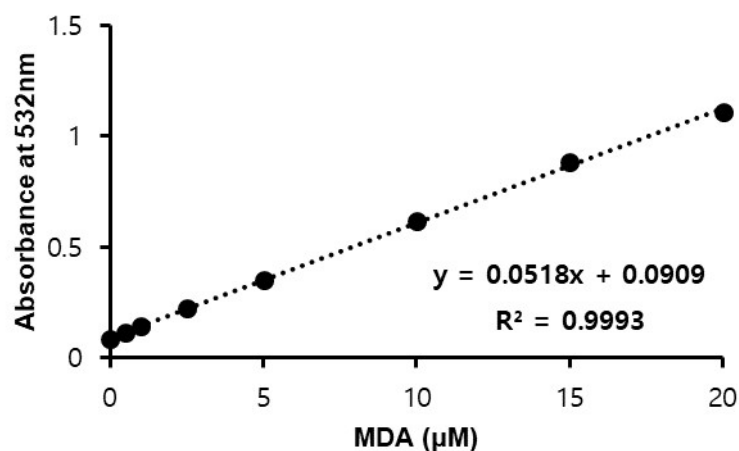


Fig. MDA standard curve. Assay was performed following the kit protocol.

▪ Related Product

	Products	Catalog No.	Assay
Oxidative Stress Assay Kit	EZ-Superoxide Dismutase (SOD) Assay Kit (Colorimetric)	DG-SOD400	400 Assay
	EZ-Glutathione Assay Kit (Colorimetric)	DG-GLU200	200 Assay
	EZ-Catalase Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-CAT400	400 Assay
	EZ-Hydrogen peroxide/Peroxidase Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-PER500	500 Assay
	EZ-Lipid Peroxidation (TBARS) Assay Kit (Colorimetric)	DG-TBA200	200 Assay
	EZ-Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay Kit (Colorimetric)	DG-TAC200	200 Assay
	EZ-DPPH Antioxidant Assay Kit (Colorimetric)	DG-DPH400	400 Assay
	EZ-ABTS Antioxidant Assay Kit (Colorimetric)	DG-ABT400	400 Assay
	EZ-Glutathione Peroxidase Assay Kit (Colorimetric)	DG-GPX100	100 Assay
Metabolism Assay Kit	EZ-Lactate Assay Kit (Colorimetric)	DG-LAC100	100 Assay
	EZ-Acetylcholinesterase Assay Kit (Colorimetric)	DG-ACE100	100 Assay
	EZ-Ascorbic Acid Assay Kit (Colorimetric)	DG-ASC100	100 Assay
	EZ-ATP Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-ATP100	100 Assay
	EZ-Free Fatty Acid Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-FFA100	100 Assay
	EZ-Free Glycerol Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-FGC100	100 Assay
	EZ-Glucose Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-GCS100	100 Assay
	EZ-HDL, LDL/VLDL Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-CHO100	100 Assay
	EZ-Total Cholesterol Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-TSC100	100 Assay
	EZ-Triglyceride Quantification Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-TGC100	100 Assay
	EZ-Nitric Oxide Assay kit (Colorimetric)	DG-NO500	500 Assay
	EZ-Total Collagen Assay Kit (Colorimetric)	DG-COL100	100 Assay
	EZ-Ethanol Assay Kit (Colorimetric)	DG-ETH100	100 Assay

