

# 甘油含量测试盒说明书

(货号:F005-1-1 适用于液体样本 100~500T)

## 一、产品描述:

甘油是甘油三酯的水解产物。甘油三酯水解生成 1 分子甘油和 3 分子游离脂肪酸,称为脂肪分解。脂蛋白酯酶水解血中甘油三酯;胰脂酶水解食物中的甘油三酯;激素敏感脂肪分解酶水解脂肪细胞中的甘油三酯。与游离脂肪酸一样,甘油含量是甘油三酯水解反应的可靠检测指标,但检测更加方便。本试剂盒采用甘油磷酸氧化酶法与经典 GPO Trinder 酶学反应,通过比色测定液体样品甘油含量。试剂盒经过优化使得操作简单,最低检测灵敏度 10 $\mu$ mol/L,线性范围 10~1200 $\mu$ mol/L,可靠性和重复性俱佳。适合生物医学、食品实验室检测。

## 二、测定原理:

在 ATP 存在下甘油被甘油激酶磷酸化为 3-磷酸甘油,再被甘油磷酸氧化酶氧化产生过氧化氢;在过氧化氢酶作用下生色底物转化为苯醌亚胺,光密度值与甘油浓度成正比。

## 三、产品用途:

测定血液、细胞培养基、体液、酒类饮料中的甘油。

## 四、试剂组成及配制:

试剂组成	规格	保存条件
试剂一	40 mL $\times$ 1 瓶	本试剂盒 4 $^{\circ}$ C 避光保存,有效期 3 个月
试剂二	10 mL $\times$ 1 瓶	
4mM 甘油标准品	1mL $\times$ 1 支	
工作液的配制:按试剂一:试剂二=4:1 比例,如取 4mL 试剂一与 1mL 试剂二混合,现用现配,用多少配多少。		
本试剂盒可供 300~500 次微板测定或 100 次 1mL 比色杯测定。		

## 五、所需仪器及试剂:

酶标仪(及 96 孔板)或可见光分光光度计(及 1mL 容量比色杯),混匀器,离心机,蒸馏水(或生理盐水),37 $^{\circ}$ C 水浴锅或恒温箱。

## 六、操作过程:

### 1、样本处理:

- ①、酒精、饮品、清澈体液样本:直接测定,如超过线性范围用蒸馏水或生理盐水稀释后测定。
- ②、培养液样本:取不含酚红无颜色无血清的细胞培养基液,如有细胞碎片应 4 $^{\circ}$ C 条件下 12,000g 离心 5min 清除,取上清测定。
- ③、血液样本:新鲜抗凝血 4 $^{\circ}$ C 2000g 离心 5min 得到血浆,或非抗凝血 4 $^{\circ}$ C 静置 2 小时后 2000g 离心 10min 除去血细胞取上清。血清(浆)70 $^{\circ}$ C 加热 10min 灭活内源脂肪酶,然后再 12000g 离心 10min,取上清测定或-20 $^{\circ}$ C 保存。

### 2、标准品稀释:

用蒸馏水将 4mM (4mmol/L) 甘油标准品倍比稀释为 1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625、7.8125  $\mu$ mol/L,通常 4~6 个浓度即可,注意设置 0 浓度对照反应管。

### 3、甘油测定:

- ①、参见表 1 或表 2 加样。先加标准甘油或待测样品,后加工作液。甘油浓度很低时,可尝试样品与工作液体积 100:100 $\mu$ L 能进一步增加检测下限,但样品超过 100 $\mu$ L 将稀释酶浓度而降低灵敏度。超出线性范围可适当稀释,根据稀释倍数计算浓度。
- ②、反应平衡后颜色在 60min 内稳定。
- ③、绘制标准曲线并计算甘油浓度。Excel 作图步骤:各标准 OD 值为 y 轴,标准品浓度为 x 轴。(1)鼠标左键圈住数据,点击做图向导,选择-散点图-,点击-

完成-(2)鼠标右键点图上的某一点,点击-添加趋势线-,点击-选项-,点击-显示公式-和-R2 值。

表 1:酶标仪测定的加样比例  
(可微量调整样品与工作液体积比例)

	低甘油浓度样品测定 (检测范围 10~120 $\mu$ mol/L)			高甘油浓度样品测定 (检测范围 100~1200 $\mu$ mol/L)		
	空白孔	标准孔	测定孔	空白孔	标准孔	测定孔
蒸馏水	50 $\mu$ L			5 $\mu$ L		
不同浓度标准品		50 $\mu$ L			5 $\mu$ L	
样品			50 $\mu$ L			5 $\mu$ L
工作液	150 $\mu$ L	150 $\mu$ L	150 $\mu$ L	195 $\mu$ L	195 $\mu$ L	195 $\mu$ L
轻轻振荡孔板混匀,37 $^{\circ}$ C 反应 20min (或 15~30min) 后,酶标仪 550nm 处读数。						

表 2:分光光度计测定的加样比例

	低甘油浓度样品测定 (检测范围 10~120 $\mu$ mol/L)			高甘油浓度样品测定 (检测范围 100~1200 $\mu$ mol/L)		
	空白管	标准管	测定管	空白管	标准管	测定管
蒸馏水	200 $\mu$ L			50 $\mu$ L		
不同浓度标准品		200 $\mu$ L			50 $\mu$ L	
样品			200 $\mu$ L			50 $\mu$ L
工作液	600 $\mu$ L	600 $\mu$ L	600 $\mu$ L	750 $\mu$ L	750 $\mu$ L	750 $\mu$ L
涡旋混匀,37 $^{\circ}$ C 反应 20min (或 15~30min) 后,波长 550nm,蒸馏水调零,分光光度计测定各管吸光值 A。						

## 七、注意事项:

- 1、细胞培养须用不含酚红的无色无血清培养基。正常血清甘油浓度为 20~130 $\mu$ mol/L。任何含血清培养基需彻底洗去。
- 2、试剂混浊或 550nm 处空白反应管吸光度大于 0.2 时弃去。
- 3、维生素 C>0.18g/L、血红蛋白>2g/L、胆红素>0.25g/L、还原剂二硫苏糖醇、巯基乙醇等干扰测试。
- 4、最佳工作波长 550nm,如无此波长建议优先选用 570、530、490nm。

## 八、参考文献:

- 1、Trinder, P. (1969). Ann. Clin. Biochem. 6:24 - 27.
- 2、Barham D and Trinder P. (1972). Analyst 97:142 - 145.