

甘油含量测试盒说明书

(货号:F005-2-1 适用于组织样本 30~100T)

一、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。

二、产品用途: 测定实体组织、细胞中的甘油浓度。

三、试剂组成及配制:

试剂组成	规格	保存条件
裂解液	50 mL×1 瓶	本试剂盒 4℃避光保存, 有效期 3 个月
试剂一	16 mL×1 瓶	
试剂二	4 mL×1 瓶	
4mM 甘油标准品	1 mL×1 瓶	
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。		
[注]:谨防来源不明但容易发生的甘油污染, 可来自操作者本人或标准品液体微粒溅射等。工作液变色弃去。		
本试剂盒可供 100 次微板测定或 30 次 1 mL 比色杯测定。		

四、所需仪器及试剂:

酶标仪 (及 96 孔板) 或可见分光光度计 (及 1mL 容量比色杯), 混匀器, 离心机, 蒸馏水 (或生理盐水), 37℃ 水浴锅或恒温箱, 蛋白测定试剂 (BCA 法) (本公司有售)。

五、操作过程:

1、样本处理

➤ 组织细胞裂解:

①、细胞 (包括分化的脂肪细胞) 裂解:

消化、离心收集细胞。或直接在培养皿内裂解。通常 6 孔板单孔约 2×10^6 个细胞, 75mm² 瓶约 1×10^7 细胞。按比例每 $1 \sim 2 \times 10^6$ 细胞加 0.1mL 裂解液, 混匀裂解。

②、动物组织裂解:

切记预先将新鲜组织称重后保存。组织冻存后再解冻称重会导致明显的测量误差。离心管精确称重, 加入新鲜组织后再称重, 二者相减 (即减量称重法) 计算组织重量 (约 50mg)。按比例每 1mg 组织加 10 μ L 裂解液。用 0.5~1mL 裂解液可保证有效的裂解。用电动高速匀浆器或手动玻璃匀浆器破碎组织。不推荐超声方法因其不能完全和均匀破碎。应根据预试验调整组织细胞加入量。

➤ 裂解液处理:

- ①、取 100~500 μ L 裂解液转移到 1.5mL 离心管, 进行下一步操作。余下的裂解液可用 BCA 法蛋白定量试剂盒 (本公司货号 A045-3 或者 A045-4) 进行蛋白定量或 -20℃ 储存。
- ②、70℃ 10 分钟灭活脂肪酶, 可能出现絮状沉淀。
- ③、室温 5000rpm 离心 5 分钟, 取上层清液待测。

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 μ mol/L, 通常 4~6 管即可, 注意设置 0 浓度对照反应管 (空白管)。

3、甘油测定:

- ①、参见下表加样, 先加标准甘油或待测样品, 后加工作液。多加可抑制反应。
- ②、反应平衡后颜色在 60 分钟内稳定。
- ③、绘制标准曲线并计算甘油浓度。Excel 作图步骤: 各标准孔 (管) 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-。

加样操作表

	酶标仪操作			分光光度计操作		
	空白孔	标准孔	测定孔	空白孔	标准孔	测定孔
蒸馏水	10 μ L			35 μ L		
不同浓度标准品		10 μ L			35 μ L	
样品			10 μ L			35 μ L
工作液	190 μ L	190 μ L	190 μ L	665 μ L	665 μ L	665 μ L
	轻轻振荡孔板混匀, 37℃ 反应 20min (或 15~30min) 后, 酶标仪 550nm 处读数。			涡旋混匀, 37℃ 反应 20min (或 15~30min) 后, 波长 550nm, 蒸馏水调零, 分光光度计测定各管 OD 值。		

六、计算:

组织 (或细胞) 中甘油含量 (μ mol / g 蛋白) = $\frac{\text{样本孔 (管) 吸光值}}{\text{代入标曲计算得值}} \div \text{Cpr}$

Cpr: 裂解液的蛋白浓度, g/L。

注: 细胞样本还可用细胞数计算, 即上述公式的 Cpr 替换成细胞密度 (10^6 /L), 结果为 μ mol/ 10^6 个细胞。

七、注意事项:

- 1、试剂混浊或空白管 OD 550nm 大于 0.2 时弃去。
- 2、维生素 C > 0.18g/L、血红蛋白 > 2g/L、胆红素 > 0.25g/L、二蔗糖醇、巯基乙醇、高浓度 EDTA 干扰测试。
- 3、红细胞糖酵解时合成磷酸甘油影响测定。
- 4、最佳工作波长 550nm, 如无此波长建议优先选用 570、530、490nm。

八、产品描述:

甘油是甘油三酯的水解产物。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。试剂盒采用优化步骤, 检测实体组织、细胞中甘油含量。

九、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.