

甘油 (Glycerol) 含量测定试剂盒说明书

(货号: G0912W500 微板法 500 样)

一、产品简介:

甘油储存于脂肪细胞中是甘油三酯代谢的最终产物之一。在生产、生活中甘油可用作溶剂, 润滑剂, 药剂和甜味剂。

甘油被甘油激酶(GK)的催化生成甘油-1-磷酸(G-1-P)。G-1-P 被甘油磷酸氧化酶(GPO)氧化生成过氧化氢(H₂O₂), H₂O₂ 与 4-氨基氨基替吡啉等反应生成红色醌类化合物, 其在 510nm 处有特征吸收峰, 通过检测 510nm 处吸光值即可得出甘油含量。

二、试剂盒的组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4°C保存	用前可用蒸馏水稀释 5 倍, 即可够提取 500 个样本。
试剂一	粉体 mg×5 支	-20°C保存	用前甩几下使试剂落入底部, 再加 4.2mL 蒸馏水, 充分震荡混匀溶解, 可-20°C分装冻存, 禁止反复冻融。
试剂二	液体 45mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液体 35mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	液体 mL×1 支	4°C保存	用前用水稀释 10 倍即成 4mM 甘油标准品待检测液。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、可调式移液枪、离心机、水浴锅、研钵、蒸馏水。

四、甘油含量测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织样本加入研钵中, 加入 1mL 提取液, 在冰上进行匀浆, 12000rpm, 4°C或室温离心 10min, 取上清液待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10⁴): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 澄清的液体样本直接测定, 若浑浊则离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min, 调节波长到 510 nm。

② 试剂解冻至室温 (25°C), 或可放在 25°C条件下水浴 5-15min。

③ 试剂一和二和三可按照 40:90:60 比例配成混合液 (一枪加 190μL 该混合液) (该混合液用多少配多少, 现配现用)。

④ 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	标准管 (仅做一次)	空白管 (仅做一次)
标准品		10	
蒸馏水			10
样本	10		
试剂一	40	40	40
试剂二	90	90	90
试剂三	60	60	60
混匀, 室温 (25°C) 避光孵育 30min, 于 510nm 读取各管 A 值 (直到 A 值不变)。			

- 【注】1. 若测定管的 A 值小于 0.05, 则需增加上样量 V1 (如增至 40μL, 则试剂二相应减小), 样本量 V1 需代入计算公式重新计算。若测定管的 A 值大于 1, 则需将样本进行稀释 (用提取液稀释) 或减少样本加样量 V1 (如减至 5μL, 则试剂二相应增加), 稀释倍数 D 或样本量 V1 需代入计算公式重新计算。
2. 若样本自身含有高的背景值或者含有高的抗氧化物质 (如 VC 等), 需要增设一个样本自身对照 (即 10μL+130μL 试剂二+60μL 试剂三, 避光反应 30min, 510nm 读取吸光值 A), 测定管减去对照管, 代入计算公式计算。

五、结果计算:

1、按样本质量计算:

$$\text{甘油 } (\mu\text{mol/g 重量}) = (\text{C 标准} \times \text{V2} \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div (\text{W} \times \text{V1} \div \text{V})) \times \text{D} \\ = 4 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{W} \times \text{D}$$

$$\text{甘油 } (\mu\text{g/g 重量}) = (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div (\text{W} \times \text{V1} \div \text{V}) \times \text{D} \\ = 368.36 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{W} \times \text{D}$$

2、按细胞数量计算:

$$\text{甘油 } (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div (500 \times \text{V1} \div \text{V}) \times \text{D} \\ = 4 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div 500 \times \text{D}$$

$$\text{甘油 } (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div (500 \times \text{V1} \div \text{V}) \times \text{D} \\ = 368.36 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div 500 \times \text{D}$$

3、液体中甘油含量计算:

$$\text{甘油 } (\text{mmol/L}) = (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{V1} \times \text{D} \\ = 4 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times \text{D}$$

$$\text{甘油 } (\mu\text{g/mL}) = (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{V1} \times \text{D} \\ = 368.36 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times \text{D}$$

C 标准---4mmol/L=4μmol/mL=368.36μg/mL;

V---提取液体积, 1mL;

V1---样本加入体积, 0.01mL;

V2---标准品加入体积, 0.01mL;

500---细胞数量, 万;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

W---样本取样质量, g。