

甘油三酯 (triglyceride, TG) 含量试剂盒说明书

(货号: ADS-F-ZF013 分光法 48 样)

一、产品简介:

甘油三酯 (TG) 是三分子长链脂肪酸和甘油形成的脂肪分子, 不仅是细胞膜的主要成分, 也是重要呼吸底物。

甘油三酯 (TG) 被脂蛋白脂肪酶水解为甘油和游离脂肪酸。甘油接着被甘油激酶(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(H_2O_2), (H_2O_2)与 4-氨基萘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 TG 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 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 1 支	4°C保存	使用前甩几下使试剂落入底部, 再加 2.2mL 蒸馏水, 充分震荡溶解备用。
试剂二	液体 18mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	粉剂 1 支	-20°C保存	使用前甩几下使试剂落入底部, 再加 2.1mL 蒸馏水, 充分震荡溶解备用。
试剂四	液体 12mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	液体 1mL×1 支	4°C保存	

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、可调式移液枪、水浴锅、离心机、研钵、蒸馏水。

四、甘油三酯 (TG) 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】: 若组织样本为高脂样本或部分为高脂样本, 需用无水乙醇进行提取。

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或室温离心 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 (10^4): 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 可见分光光度计预热 30min, 调节波长到 510 nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C)。

③ 在 EP 管中依次加入:

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		60	
样本	60		
试剂一	40	40	40
试剂二	340	340	400
试剂三	40	40	40
试剂四	220	220	220
混匀, 室温 (25°C) 避光孵育 20min, 全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 于 510nm 处比色, 读取各管 A 值。			

- 【注】1. 若测定管的 A 值大于 0.5, 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 40μL, 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. 若样本为血清, 蛋黄 (需用乙醇提取) 等高 TG 样本, 可把样本 V1 降为 10μL, 另用 50μL 蒸馏水补齐, 再按照上述加样表操作测定, 则改变后的 V1 需带入公司计算。
3. 若样本自身含有高的甘油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 60μL+340μL 试剂二+40μL 试剂三+220μL 试剂四, 避光反应 20min, 510nm 读取吸光值 A), 测定管减去对照管, 代入计算公式计算。
4. 若 A 测定-A 空白的值小于 0.01, 则可增加样本加样量 V1 (如由 60μL 增至 120μL, 则试剂二相应减少), 则改变后的 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、按样本质量计算:

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

$$=500 \times (A \text{ 测定}-A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准}-A \text{ 空白}) \div W \times D$$

2、按细胞数量计算:

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

$$=(A \text{ 测定}-A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准}-A \text{ 空白}) \times D$$

3、液体中 TG 含量计算:

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

$$=500 \times (A \text{ 测定}-A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准}-A \text{ 空白}) \times D$$

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

$$=0.782 \times (A \text{ 测定}-A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准}-A \text{ 空白}) \times D$$

C 标准---标品浓度, 0.5mg/mL=500μg/mL;

V---提取液体积, 1mL;

V2---标准品加入体积, 0.06mL;

500---细胞数量, 万;

Mr---甘油三酯分子量, 639;

V1---样本加入体积, 0.06mL;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

W---样本取样质量, g。