

甘油三酯 (triglyceride, TG) 含量测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-ZF013 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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-氨基氨基吡啶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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 1 瓶	-20℃避光保存	1. 开盖前注意使液体落入底部(可手动甩一甩); 2. 再加 2.2mL 蒸馏水, 充分震荡溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉剂 1 瓶	-20℃保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 2.1mL 蒸馏水, 充分震荡溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	液体 6mL×1 瓶	4℃避光保存	
标准品	粉剂×1 支	4℃保存	1. 临用前加 1ml 无水乙醇; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、无水乙醇、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

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℃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℃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、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min，调节波长到 510 nm。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃）。
- ③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管	标准管 （仅做一次）	空白管 （仅做一次）
标准品		20	
样本	20		
试剂一	20	20	20
试剂二	80	80	100
试剂三	20	20	20
试剂四	60	60	60
混匀，室温（25℃）避光孵育 30min，于 510nm 读取各管 A 值。			

- 【注】1. 若测定管的 A 值大于 0.3，则可将样本进行稀释（用提取液稀释）或减少样本加样量 V1（如减至 10μL，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 2.5μL，另用 17.5μL 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 20μL+100μL 试剂二+20μL 试剂三+60μL 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 20μL 增至 50μL，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：

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

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

2、按细胞数量计算：

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

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

3、液体中 TG 含量计算：

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

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

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

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

4、按蛋白浓度计算：

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

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

C 标准---标品浓度，0.5mg/mL=500μg/mL； Mr---甘油三酯分子量，639；
V---提取液体积，1mL； V1---样本加入体积，0.02mL；
V2---标准品加入体积，0.02mL； D---稀释倍数，未稀释即为 1；
500---细胞数量，万； W---样本取样质量，g。
Cpr---蛋白浓度（mg/mL）； 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。