

甘油 (Glycerol) 含量测定试剂盒说明书

(货号: ADS-F-ZF027 分光法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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(H_2O_2), (H_2O_2)与 4-氨基氨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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体 1 瓶	-20℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 4.2mL 蒸馏水, 充分震荡混匀溶解; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 25mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 6mL×1 瓶	4℃避光保存	
标准品	液体 1mL×1 支	4℃避光保存	1. 用前用水稀释 10 倍即成 4mM 甘油标准品待检测液; 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)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、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℃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 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 510nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温(25℃)。

③ 在 EP 管中依次加入:

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	
蒸馏水			20
样本	20		
试剂一	80	80	80
试剂二	480	480	480
试剂三	120	120	120
混匀，室温（25℃）避光孵育 30min，将全部液体转移至 1mL 比色皿中于 510nm 处读取各管 A 值(直到 2min 内 A 值变化不超过 0.05)。			

- 【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 20μL+560μL 试剂二+120μL 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

$$\begin{aligned}\text{甘油 } (\mu\text{mol/g 重量}) &= (C \text{ 标准} \times V_2) \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div (W \times V_1 \div V) \times D \\ &= 4 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W \times D \\ \text{甘油 } (\mu\text{g/g 重量}) &= (C \text{ 标准} \times V_2) \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div (W \times V_1 \div V) \times D \\ &= 368.36 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W \times D\end{aligned}$$

2、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned}\text{甘油 } (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= (C \text{ 标准} \times V_2) \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div (500 \times V_1 \div V) \times D \\ &= 4 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div 500 \times D \\ \text{甘油 } (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= (C \text{ 标准} \times V_2) \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div (500 \times V_1 \div V) \times D \\ &= 368.36 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div 500 \times D\end{aligned}$$

3、液体中甘油含量计算：

$$\begin{aligned}\text{甘油 } (\text{mmol/L}) &= (C \text{ 标准} \times V_2) \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div V_1 \times D \\ &= 4 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times D \\ \text{甘油 } (\mu\text{g/mL}) &= (C \text{ 标准} \times V_2) \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div V_1 \times D \\ &= 368.36 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times D\end{aligned}$$

4、按蛋白浓度计算

$$\begin{aligned}\text{甘油 } (\mu\text{mol/mg prot}) &= (C \text{ 标准} \times V_2) \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div (C_{pr} \times V_1 \div V) \times D \\ &= 4 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div C_{pr} \times D \\ \text{甘油 } (\mu\text{g/mg prot}) &= (C \text{ 标准} \times V_2) \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div (C_{pr} \times V_1 \div V) \times D \\ &= 368.36 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div C_{pr} \times D\end{aligned}$$

C 标准---4mmol/L=4μmol/mL=368.36μg/mL；

V---提取液体积，1mL；

V1---样本加入体积，0.02mL；

V2---标准品加入体积，0.02mL；

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。

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。