

注 意：正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定

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 处吸光值即可得出甘油含量。

所需的仪器和用品：

酶标仪、96孔板、可调式移液器、离心机、研钵、匀浆器、蒸馏水。

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℃保存	
试剂一	粉体 mg×1支	-20℃保存	
试剂二	液体 9mL×1瓶	4℃保存	
试剂三	液体 6mL×1瓶	4℃保存	
标准品	液体 mL×1支	4℃保存	用前用水稀释50 倍即成0.8mM 甘油标准品待检测液。
空瓶	透明 8mL ×1瓶		用于试剂一转移溶解

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min，调节波长到 510 nm。

② 试剂一的制备：

1. 开盖前用力甩几下使粉剂落入底部；
2. 准备 4.2mL 预冷过的蒸馏水；
3. 向试剂一中加入1mL 蒸馏水，震荡混匀（使粉剂悬浮在液体中即可）；
4. 将液体转移至匀浆器中充分匀浆；
5. 匀浆后转移到瓶中；
6. 步骤 3 - 5 重复操作多次（用于冲洗试剂一与匀浆器中残留）；
7. 充分震荡混匀后使用。

（注意：1. 试剂一现用现配，放置后容易凝聚蛋白絮状物；2. 加入试剂一的蒸馏水总体积为 4.2mL；3. 一定要多次冲洗试剂一

与匀浆器（步骤6）以控制损耗；）

③ 其他试剂解冻至室温（25℃）。

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	100
试剂三	60	60	60
混匀，室温 (25℃) 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+100μL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。

试剂一溶解后不建议保存，如果保存请 -20℃ 冷冻，再次使用时可能会有蛋白絮状物，使用移液器反复吹打混匀 取上清使用。

甘油含量测定：

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℃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。

结果计算：

1、按样本质量计算：

$$\begin{aligned}\text{甘油} (\mu\text{mol/g 重量}) &= (\text{C 标准} \times \text{V}_2) \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div (\text{W} \times \text{V}_1 \div \text{V}) \times \text{D} \\ &= 0.8 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{W} \times \text{D}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{甘油} (\mu\text{g/g 重量}) &= (\text{C 标准} \times \text{V}_2) \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div (\text{W} \times \text{V}_1 \div \text{V}) \times \text{D} \\ &= 73.672 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{W} \times \text{D}\end{aligned}$$

2、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned}\text{甘油} (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= (\text{C 标准} \times \text{V}_2) \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div (500 \times \text{V}_1 \div \text{V}) \times \text{D} \\ &= 0.8 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div 500 \times \text{D}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{甘油} (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= (\text{C 标准} \times \text{V}_2) \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div (500 \times \text{V}_1 \div \text{V}) \times \text{D} \\ &= 73.672 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div 500 \times \text{D}\end{aligned}$$

3、液体中甘油含量计算：

$$\begin{aligned}\text{甘油} (\text{mmol/L}) &= (\text{C 标准} \times \text{V}_2) \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{V}_1 \times \text{D} \\ &= 0.8 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times \text{D}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{甘油} (\mu\text{g/mL}) &= (\text{C 标准} \times \text{V}_2) \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{V}_1 \times \text{D} \\ &= 73.672 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times \text{D}\end{aligned}$$

C 标准---0.8mmol/L=0.8 μ mol/mL=73.672 μ g/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，百万； D---稀释倍数,未稀释即为 1；

W---样本取样质量，g。

预实验的意义：

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；
- 5、通过3 - 5组预实验，判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。

