

甘油三酯含量检测试剂盒说明书

(货号: PB1191F48 分光法 48 样)

有效期: 3 个月

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!

测定意义:

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。

测定原理:

甘油三酯被脂蛋白脂肪酶水解成甘油和脂肪酸, 生成的甘油在 ATP 和甘油激酶的作用下磷酸化为甘油-3-磷酸和 ADP, 生成的甘油-3-磷酸再在甘油磷酸氧化酶的作用下和氧气发生氧化反应产生磷酸二羟丙酮和 H_2O_2 , H_2O_2 与 4-氨基氨替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。

需自备的仪器和用品:

酶标仪、水浴锅、离心机、可调式移液器、96 孔板、研钵和蒸馏水、无水乙醇

试剂的组成和配制:

试剂一: 液体 30ml×1 瓶, -20℃避光保存, 若未用完, 可分装保存, 避免反复化冻;

试剂二: 液体 30ml×1 瓶, -20℃避光保存, 若未用完, 可分装保存, 避免反复化冻;

标准品: 液体 0.5ml×1 瓶, 10mmol/L 标准品溶液, 4℃保存; 若出现沉淀 37℃水浴至澄清即可。

样本制备:

(1) 液体样本: 直接测定, 如超过线性范围用生理盐水稀释后测定。

(2) 组织样本: 称取组织 0.1g, 加入 1ml 匀浆介质, 冰水浴条件下匀浆, 12000rpm 4℃或室温离心 10 分钟, 取上清液待测。

[注]: 如组织样本为非高脂样本, 匀浆介质用磷酸盐缓冲液 (0.1mol/L pH 7.4) 或生理盐水 (0.9%) 进行提取; 如组织样本为高脂样本或部分为高脂样本, 匀浆介质可统一用无水乙醇进行提取。

(3) 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 磷酸盐缓冲液 (0.1mol/L pH 7.4) 或生理盐水 (0.9%), 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。

测定步骤:

1、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、标准曲线的制备: 取 10mmol/L 的标准液用无水乙醇水稀释成不同浓度: 0.2mmol/L、0.5mmol/L、1mmol/L、2mmol/L、5mmol/L, 进行标准曲线的制备。

浓度	标准液 (μl)	无水乙醇 (μl)
0.2mmol/L	20	980
0.5mmol/L	50	950
1mmol/L	10	90
2mmol/L	20	80
5mmol/L	50	50

4、加样表：在 EP 管中依次加入

试剂 (μL)	空白管	标准管	测定管
样本			25
标准品		25	
蒸馏水	25		
试剂一	500	500	500
试剂二	500	500	500

37℃避光孵育 20min，取 1ml 于比色皿中，510nm 处波长处读取吸光度，分别记为 A 测定管，A 标准管，A 空白管，计算 $\Delta A_{测定} = A_{测定管} - A_{空白管}$ ； $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管}$ 。

甘油三酯含量计算：

1、标准曲线的绘制 以各标准溶液浓度为 x 轴，以其对应的吸光值 ($\Delta A_{标准}$) 为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 $\Delta A_{测定}$ 带入公式中得到 x (mmol/L)。

2、甘油三酯含量计算

(1) 按照样本蛋白浓度计算

$$\text{甘油三酯含量 (mmol/mg prot)} = x \div Cpr \times 10^{-3} = x \div Cpr \times 10^{-3}$$

(2) 按照样本质量计算

$$\text{甘油三酯含量 (mmol/g 鲜重)} = x \times V_{样总} \div W \times 10^{-3}$$

(3) 按照细胞数量计算

$$\text{甘油三酯含量 (mmol/10}^4\text{cell)} = x \times V_{样总} \div 500 \times 10^{-3}$$

(4) 按照液体体积计算

$$\text{甘油三酯含量 (mmol/L)} = x$$

W: 样本质量, g; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL, 蛋白浓度需自行测定; V 样总: 加入的提取液体积, 1mL; 500: 细胞数量, 500 万; 10^{-3} : 1mmol/L = 10^{-3} mmol/ml。

注意事项

①若测定吸光值超出标准吸光值线性范围：高于最高值建议适当延长酶促反应时间（25℃准确反应时间）或增加样本量重新提取后再进行测定，低于最低值建议将粗酶液使用提取液适当稀释后再进行测定，计算时相应修改。