

甘油含量

规格：微量法 96 样,带标准品

检测波长：505nm

检测原理：酶法

注 意：

- 1、正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定；
- 2、为了您的安全和健康，请佩戴好防护用具；

测定意义：

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。

测定原理：

甘油 (Glycerol) 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-氨基氨基匹啶等反应生成红色醌类化合物，其在 505nm 处有特征吸收峰，通过检测 505nm 处吸光值即可得出甘油含量。

自备仪器和用品：

酶标仪、台式离心机、可调式移液枪、96 孔板、研钵、冰和蒸馏水

试剂清单：

试剂名称	规格	数目	贮藏	
提取液	液体 120mL	x1	4°C	
试剂一	液体 12mL	x1	-20°C	
试剂二	液体 12mL	x1	4°C,避光	
标准品(100X)	液体 1mL	x1	4°C	100mmol/L 甘油

注意：

- 1、提取液为异丙醇 易挥发，注意及时盖紧；
- 2、试剂一短期内可 4°C 保存，如果短期内用不完需要提前分装后 -20°C 冻存，不可反复冻融；

样品提取（按照步骤依次操作）：

一、组织

- 1、按照组织质量 (g)：提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液) 进行冰浴匀浆；
- 2、然后 12,000rpm 4°C 离心 10min，取上清待测。

二、细胞、细菌

- 1、先收集 400-500 万细胞或细菌到离心管内，离心后弃上清，加 1mL 提取液，超声波破碎 1min (强度 20%，超声 2s，停 1s)；
- 2、然后 12,000rpm 4°C 离心 10min，取上清待测。

三、血清（浆）等液体样本

澄清样本可直接检测，若浑浊则离心取上清检测；

实验准备：

- 1、酶标仪预热 30min 以上，调节波长到 505nm；
- 2、标准品的制备：用前将 标准品(100X) 用 蒸馏水 稀释 100 倍，即为 1mmol/L 甘油标准液；

测定操作：

试剂名称 (μL)	测定管	标准管 (只做一管)	空白管 (只做一管)
样本	10	-	-
标准品	-	10	-
提取液	-	-	10
试剂一	95	95	95
试剂二	95	95	95
混匀，37°C反应 30min，于 505nm 测定吸光值 A			

注意：

- 1、如果测定管吸光值 $A > 1.2$ ，则可将样本稀释，稀释倍数 D 需代入计算公式重新计算；
- 2、如果测定管吸光值 $A < 0.05$ ，可增加样本量后测定；

结果计算：

(1) 按血清 (浆) 等液体样本计算

$$\begin{aligned}\text{甘油含量}(\mu\text{mol}/\text{mL}) &= (C \times V_2) \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V_1 \times D \\ &= (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{甘油含量}(\mu\text{g}/\text{mL}) &= (C \times V_2 \times M_r) \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V_1 \times D \\ &= 92.09 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D\end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

$$\begin{aligned}\text{甘油含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) &= (C \times V_2) \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (W \times V_1 \div V) \times D \\ &= (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{甘油含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) &= (C \times V_2 \times M_r) \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (W \times V_1 \div V) \times D \\ &= 92.09 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D\end{aligned}$$

(3) 按细胞、细菌数量计算

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

$$\begin{aligned}\text{甘油含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= (C \times V_2 \times M_r) \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (500 \times V_1 \div V) \times D \\ &= 92.09 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div 500 \times D\end{aligned}$$

C: 标准品浓度, 1mmol/L=1μmol/mL;

Mr: 甘油分子量, 92.09

V: 样本中加入的提取液体积, 1mL;

500: 细胞数量 (万个);

V1: 样本加入体积, 0.01mL;

W: 样本取样质量, g。

V2: 标准品加入体积, 0.01mL;

D: 额外稀释倍数, 未稀释即为 1;

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。