组织细胞甘油酶法测定试剂盒 E1012

描述: 甘油是甘油三酯的水解产物。与游离脂肪酸一样,甘油含量是甘油三酯水解反应的可靠检测指标,但检测更加方便。本试剂盒采用优化步骤,能够检测实体组织、细胞中的甘油含量,线性范围为10-1200μmol/L。

原理: 在 ATP 存在下甘油被甘油激酶磷酸化为 3-磷酸甘油,再被甘油磷酸氧化酶氧化产生过氧化 氢;在过氧化物酶作用下生色底物转化为苯醌亚 胺,其光密度值与甘油浓度成正比。

适用范围:测定实体组织、细胞中的甘油浓度。

组成 (105 次微板测定或 30 次 1 ml 比色杯测定):

- (1) 裂解液 50 ml
- (2) R1 试剂 16 ml
- (3) R2 试剂 4 ml
- (4) 4 mmol/L 甘油标准品 1 ml 4 ℃ 保存 6 个月有效

所需设备: 酶标仪、生化分析仪或 721、722 型可见光分光光度计。最佳工作波长 550nm,如无此波长建议优先选用 570nm、次选 530、490nm。

一 组织细胞裂解

细胞(包括分化的脂肪细胞)裂解:

消化、离心收集细胞。或直接在培养皿内裂解。通常 6 孔板单孔约 $2x10^6$ 个细胞, $75cm^2$ 瓶约 $1x10^7$ 细胞。按比例每 $1~2 \times 10^6$ 细胞加 0.1ml 裂解液,震荡或涡旋裂解后,静置 10 分钟。

动物组织裂解:

切记要预先将新鲜组织剪切称重后再进行保存。组织冻存后再进行解冻、剪切、称重可能会产生严重的测量误差。离心管精确称重,加入组织块后再称重,二者相减(即减量称重法)计算组织重量(约 100mg)。强烈建议按比例每 1mg 组织加10µ1裂解液以减少样品间蛋白和脂质含量变异而产生的误差。(注意; 裂解液用量在 1ml 或更多可保证有效的裂解与脂质提取)。用电动高速匀浆器或手动玻璃匀浆器破碎组织。(不推荐超声方法,因其不能完全和均匀破碎。应根据预实验调整初始的组织细胞加入量),而后,静置 10 分钟。

二. 裂解液处理:

1. 取适量上清液转移到 1.5ml 离心管中,进行步骤 2 的操作。余下的裂解液可用 BCA 法蛋白定量 试剂盒(#P1511)进行蛋白定量或一20℃ 储存。

- 2. 70℃ 加热 10 分钟灭活脂肪酶,可能出现絮状沉 淀。
- 3. 室温 5000rpm 离心 5 分钟,上层清液即可用于 酶学测定。

三 工作溶液配制: 按 4:1 比例,取 4 ml 试剂 R1 与 1 ml 试剂 R2 混合即可,立即使用或 4 C 保存<1 天,变色弃去。(注意: 谨防来源不明但容易发生的甘油污染,可来自操作者本人或标准品液体微粒溅射等。)

四 标准品稀释: 用蒸馏水、生理盐水或与样品缓冲液一致的液体,将 4 mM 甘油标准品倍比稀释为 1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625、7.8125 $\mu mol/L$,通常取其中 4~6 管即可,注意设置 0 浓度 对照反应管。

五 甘油测定

- 1. 参见下表加样。待测样品体积 10µl,多加可能 会抑制反应。
- 37℃或25℃反应10分钟。反应平衡后颜色在60分钟内稳定。
- 3. 先用蒸馏水+工作液的空白管调零,然后测定各管 OD 值。
- 4. 绘制标准曲线并计算甘油浓度。 附 Fycel 作图步骤, 条标准管 C

附 Excel 作图步骤:各标准管 OD 值为 y 轴,标准品浓度为 x 轴。(1)鼠标左键圈住数据,点击做图向导,选择-散点图-,点击-完成-。(2)鼠标右键点图上的某一点,点击-添加趋势线-,点击-选项-,点击-显示公式-和- R^2 值-。

5. 以每 mg 蛋白浓度或细胞数校正甘油含量。 **加样表**(可对样品和工作液比例进行微量调整)

	96 孔微板测定			1 ml 比色杯测定		
	空白管	标准 品	样品	空白管	标准 品	样品
蒸馏水 µl	10			35		
标准品 µl		10			35	
样品μl			10			35
工作液 μl	190	190	190	665	665	665

说明:

- 1.维生素C>0.18g/L、血红蛋白>2g/L、胆红素>0.25g/L、 二硫苏糖醇、巯基乙醇、高浓度EDTA干扰测试。
- 2.红细胞糖酵解时合成磷酸甘油影响测定。

参考文献:

- 1. Trinder, P. (1969). Ann. Clin. Biochem. 6: 24 27.
- 2. Barham D and Trinder P. (1972). Analyst 97: 142 1