

## 液体样本甘油酶法测定试剂盒 E1002

**描述:** 甘油是甘油三酯的水解产物。脂蛋白酯酶能够水解血液中的甘油三酯; 胰脂酶可以水解食物中的甘油三酯; 激素敏感脂肪分解酶能够水解脂肪细胞中的甘油三酯。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。本试剂盒采用甘油磷酸氧化酶法与经典的 GPO-Trinder 酶学反应方法, 通过比色测定液体样本中的甘油含量。经过优化后, 操作步骤更加简单, 检测线性范围在 10-1200 $\mu\text{mol/L}$ , 可靠性和重复性俱佳, 适合生物医学、食品实验室检测。

**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:** 测定血液、细胞培养基、体液、酒类饮料中的甘油浓度。

**组成:** (以 250 次为例)

- (1) R1 试剂 40 ml
  - (2) R2 试剂 10 ml
  - (3) 4 mmol/L 甘油标准品 1 ml
- 4 $^{\circ}\text{C}$  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 样本处理:

1. **酒类、饮品、清澈液体样本:** 可直接进行测定, 如超过线性范围可用蒸馏水或生理盐水稀释后再进行测定。
2. **培养液:** 取不含酚红、无颜色、无血清的细胞培养基, 如有细胞碎片应 4 $^{\circ}\text{C}$ , 12,000g 离心 5min, 取上清进行测定。
3. **血液:** 对于新鲜抗凝血而言, 可 4 $^{\circ}\text{C}$ , 2,000g 离心 5min 得到血浆; 而对于非抗凝血来说, 可先 4 $^{\circ}\text{C}$  静置 2h 得到血清后, 2000g 离心 10min, 除去血细胞。将得到的血浆/血清 70 $^{\circ}\text{C}$  加热 10 分钟灭活内源脂肪酶, 12,000g 离心 10min, 去上清进行测定或 -20 $^{\circ}\text{C}$  保存。

**二 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 $^{\circ}\text{C}$  保存 <1 天, 变色弃去。

**三 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  $\mu\text{mol/L}$ , 通常取其中 4~6 管即可, 注意设置 0 浓度对照反应管。

### 四 甘油浓度测定:

1. 参见下表进行加样。为使反应时间尽量一致, 减小实验误差, 可先加入标准品、待测样品, 然后再加入工作溶

液。(注意: 当甘油浓度较低时, 可将待测样品与工作溶液按照 100 $\mu\text{l}$ :100 $\mu\text{l}$  体积进行混合, 然后再进行测定, 但是如果样品体积超过 100 $\mu\text{l}$  时将会稀释工作液中酶的浓度, 致使反应灵敏度下降。如果待测样品浓度超过线性范围的时候, 可进行适当稀释, 然后根据稀释倍数来计算样品中甘油浓度。)

2. 37 $^{\circ}\text{C}$  或 25 $^{\circ}\text{C}$  反应 15 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 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<sup>2</sup>值-。

表一:

#### 酶标板测定的加样比例 (检测范围 10-1200 $\mu\text{mol/L}$ )

(可对样品和工作液比例进行微量调整)

	低浓度甘油样品测定			高浓度甘油样品测定		
	空白管	标准品	样本管	空白管	标准品	样本管
蒸馏水 $\mu\text{l}$	50			5		
标准品 $\mu\text{l}$		50			5	
样品 $\mu\text{l}$			50			5
工作液 $\mu\text{l}$	150	150	150	195	195	195

表二:

#### 1 ml 比色杯测定的加样比例 (检测范围 10-1200 $\mu\text{mol/L}$ )

	低浓度甘油样品测定			高浓度甘油样品测定		
	空白管	标准品	样本管	空白管	标准品	样本管
蒸馏水 $\mu\text{l}$	200			50		
标准品 $\mu\text{l}$		200			50	
样品 $\mu\text{l}$			200			50
工作液 $\mu\text{l}$	600	600	600	750	750	750

### 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. 正常血清甘油浓度为 20-130 $\mu\text{mol/L}$ , 细胞培养时须用不含酚红的无色无血清培养基, 如果培养基中含有酚红, 可以选择含有酚红的无细胞培养基作为对照进行测定。

### 参考文献:

1. Trinder, P. (1969). Ann. Clin. Biochem. 6: 24 - 27.
2. Barham D and Trinder P. (1972). Analyst 97: 142 - 145