

组织细胞甘油三酯酶法测定试剂盒 E1013

描述: 甘油三酯是由甘油和脂肪酸酯化而成, 是血脂的主要成分, 也是机体重要的供能物质。高甘油三酯和高胆固醇血症是临床常见的高脂血症, 与许多疾病相关。与血浆甘油三酯测定相比, 实体组织和细胞的甘油三酯测定并非易事。本试剂盒避免了有毒的氯仿甲醇提取、繁杂的氮气吹干和脂质复溶等步骤, 采用高效能试剂进行组织细胞裂解和甘油三酯抽提, 而且优化了 GPO Trinder 酶学反应组分和操作步骤。简单易行、灵敏度高检测范围为 20-2000 $\mu\text{mol/L}$ 。可用于测量动植物组织细胞、样品中的甘油三酯含量。

原理: (1) 脂肪酶分解血清中的甘油三酯为甘油; (2) 甘油激酶将甘油磷酸化为 3-磷酸甘油; (3) 3-磷酸甘油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: 适用于动物实体组织、培养细胞样品中甘油三酯含量的测定。

组成: (105 次测定)

- (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 $^{\circ}\text{C}$ 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。

操作步骤:

一 **组织细胞裂解:** (在裂解前, 组织或者细胞用 PBS 洗涤两次以去除甘油)

1. **原代脂肪细胞:** 200g, 5 分钟离心收集细胞。建议每 100 μl 压积 (Packed Cell Volume) 脂肪细胞加入 1ml 裂解液, 震荡裂解, 而后室温静

置 10 分钟。

2. **分化脂肪细胞或非脂肪细胞:** 可先用胰酶消化、离心收集细胞而后进行裂解, 也可直接在培养皿内进行裂解。通常情况下, (6 孔板单孔约为 2×10^6 个细胞, 75 cm^2 瓶约为 1×10^6 个细胞) 可按比例每 1×10^6 个细胞加入 0.1ml 裂解液, 混匀后室温静置 10 分钟。
3. **动物组织:** 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 50mg)。强烈建议按比例每 1mg 组织加 20 μl 裂解液以减少样品间蛋白和脂质含量变异而产生的误差。**强烈建议**裂解液用量在 1ml 左右, 保证有效的匀浆裂解与脂质提取。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), 匀浆后静置 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 -20 $^{\circ}\text{C}$ 储存。
2. 70 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 分钟, 组织量多时可能出现絮状沉淀。
3. 室温 2000rpm 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 $^{\circ}\text{C}$ 保存 <1 天, 变色弃去。

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

四 甘油三酯浓度测定:

145

1. 参见下表进行加样。以 96 孔板为例，待测样品体积可在 5、10、20 μ l 之间，推荐以 10 μ l 为起始加样量。如果样品测量值超出线性范围，可进行适当稀释，最后根据稀释倍数计算浓度。
2. 37 $^{\circ}$ C 或 25 $^{\circ}$ 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三酯浓度。

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-R²值-。

5. 以每 mg 蛋白浓度或细胞数校正甘油三酯含量。

说明:

1. 维生素C>0.18g/L、血红蛋白>2g/L、胆红素>0.25g/L、强还原剂二硫苏糖醇、巯基乙醇等会干扰测定。高浓度EDTA会干扰测定。
2. 样本即使保存在-20 $^{\circ}$ C的环境下，甘油三酯也会自发水解。因此建议样品4 $^{\circ}$ C保存时间应短于24小时，当-70 $^{\circ}$ C保存时，也应不超过1个月。
3. 如果室温较低，应延长反应时间或在37 $^{\circ}$ C进行反应。
4. 不同类型组织和细胞内甘油三酯含量差别很大，应根据预实验调整初始的裂解液的加入量。对于脂肪组织而言，一般来说裂解液用量在10-20mg/ml即可。

参考文献:

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

加样比例 (检测范围 20-2000 μ mol/L)

(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 μ l	10			35		
标准品 μ l		10			35	
样品 μ l			10			35
工作液 μ l	190	190	190	665	665	665

目前应用北京普利莱甘油三酯测定试剂盒发表的文章已超百篇，部分列举如下：

Zhang Xuequn, Yang Juntao, Guo Yuanbiao, Ye Hua, Yu Chaohui, Xu Chengfu, Xu Lei, Wu Songfeng, Sun Wei, Wei Hangdong, Gao Xue, Zhu Yunping, Qian Xiaohong, Jiang Ying, Li Youming, He Fuchu, Functional proteomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease in rat models: Enoyl-coenzyme a hydratase down-regulation exacerbates hepatic steatosis. Hepatology, 51(4): 1190-1199.

Luo Zhidan, Ma Liqun, Zhao Zhigang, He Hongbo, Yang Dachun, Feng Xiaoli, Ma Shuangtao, Chen Xiaoping, Zhu Tianqi, Cao Tingbing, Liu Daoyan, Nilius Bernd, Huang Yu, Yan Zhencheng, Zhu Zhiming, 2011. TRPV1 activation improves exercise endurance and energy metabolism through PGC-1 α upregulation in mice. Cell Research, doi:10.1038/cr.2011.205.

Pang Shanshan, Tang Haiqing, Zhuo Shu, Qin Zang Ying, Le Yingying, 2010. Regulation of Fasting Fuel Metabolism by Toll-Like Receptor 4. Diabetes, 59(12): 3041-3048.

Yang Zhi, Yin Ji-Ye, Gong Zhi-Cheng, Huang Qiong, Chen Hao, Zhang Wei, Zhou Hong-Hao, Liu Zhao-Qian, 2009. Evidence for an effect of clozapine on the regulation of fat-cell derived factors. Clinica Chimica Acta, 408(1-2): 98-104.