

## 油脂食品甘油三酯酶法测定试剂盒 E1014

**描述:** 试剂盒采用高效能试剂进行样本裂解和甘油三酯抽提, 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 $\mu\text{mol/L}$ 。可用于测量固态食品材料、含高浓度油料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:** 适用于固态食品材料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。

**操作步骤:**

### 一. 样本处理:

减量称重法精确称重。推荐裂解液用量在 1ml 左右, 按比例每 1mg 组织加 20 $\mu\text{l}$  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。

### 五. 甘油三酯浓度测定:

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 $\mu\text{l}$  之间, 推荐以 10 $\mu\text{l}$  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 $^{\circ}\text{C}$  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-R<sup>2</sup>值-。
5. 以每 mg 蛋白浓度校正甘油三酯含量。

**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。高浓度 EDTA 会干扰测定。
2. 样本即使保存在 -20 $^{\circ}\text{C}$  的环境下, 甘油三酯也会自发水解。因此建议样品 4 $^{\circ}\text{C}$  保存时间应短于 24 小时, 当 -70 $^{\circ}\text{C}$  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 $^{\circ}\text{C}$  进行反应。

**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

### 加样比例 (检测范围 20-2000 $\mu\text{mol/L}$ )

(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 $\mu\text{l}$	10			35		
标准品 $\mu\text{l}$		10			35	
样品 $\mu\text{l}$			10			35
工作液 $\mu\text{l}$	190	190	190	665	665	665