

高脂样本甘油酶法测定试剂盒 (如肝脏、脂肪细胞) E1024

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 10-1200 $\mu\text{mol/L}$ 。

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 100 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。

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 2×10^6 个细胞, 75 cm^2 瓶约 1×10^7 细胞。按比例每 $1 \sim 2 \times 10^6$ 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 10 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。(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 -20°C 储存。

2. 70°C 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 $\mu\text{mol/L}$, 通常取其中 4~6 管即可, 注意设置 0 浓度对照反应管。

五 甘油测定

1. 参见下表加样。待测样品体积 10 μl , 多加可能会抑制反应。
2. 37°C 或 25°C 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 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、二巯苏糖醇、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