

甘油 (Glycerol) 含量测定试剂盒说明书

(微板法 96 样)

一、产品简介：

甘油储存于脂肪细胞中是甘油三酯代谢的最终产物之一。在生产、生活中甘油可用作溶剂，润滑剂，药剂和甜味剂。

甘油被甘油激酶(GK)的催化生成甘油-1-磷酸(G-1-P)。G-1-P 被甘油磷酸氧化酶(GPO)氧化生成过氧化氢(H₂O₂)，H₂O₂ 与 4-氨基氨基替吡啉等反应生成红色醌类化合物，其在 510nm 处有特征吸收峰，通过检测 510nm 处吸光值即可得出甘油含量。

二、试剂盒的组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体 mg×1 支	-20℃保存	用前甩几下使试剂落入底部，再加 4.2mL 蒸馏水，充分震荡混匀溶解。
试剂二	液体 9mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 6mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	液体 mL×1 支	4℃保存	用前用水稀释 10 倍即成 4mM 甘油标准品待检测液。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、可调式移液枪、离心机、研钵、蒸馏水。

四、甘油含量测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 组织样本：

称取约 0.1g 组织样本加入研钵中，加入 1mL 提取液，在冰上进行匀浆，12000rpm，4℃或室温离心 10min，取上清液待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量 (g)：提取液(mL)为 1：5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量 (10⁴)：提取液 (mL) 为 500~1000：1 的比例进行提取。

③ 液体样本：澄清的液体样本直接测定，若浑浊则离心后取上清检测。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min，调节波长到 510 nm。

② 所有试剂解冻至室温 (25℃)。

③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	标准管 (仅做一次)	空白管 (仅做一次)
标准品		10	
蒸馏水			10
样本	10		

试剂一	40	40	40
试剂二	90	90	100
试剂三	60	60	60
混匀，室温（25℃）避光孵育 30min，于 510nm 读取各管 A 值 （直到 A 值不变）。			

- 【注】1. 若测定管的 A 值小于 0.05，则需增加上样量 V1（如增至 40μL，则试剂二相应减小），样本量 V1 需代入计算公式重新计算。若测定管的 A 值大于 1，则需将样本进行稀释（用提取液稀释）或减少样本加样量 V1（如减至 5μL，则试剂二相应增加），稀释倍数 D 或样本量 V1 需代入计算公式重新计算。
2. 若样本自身含有高的背景值或者含有高的抗氧化物质（如 VC 等），需要增设一个样本自身对照（即 10μL+100μL 试剂二+60μL 试剂三，避光反应 30min，510nm 读取吸光值 A），测定管减去对照管，代入计算公式计算。

五、结果计算：

1、按样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{甘油}(\mu\text{mol/g 重量}) &= (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div (\text{W} \times \text{V1} \div \text{V}) \times \text{D} \\ &= 4 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{W} \times \text{D} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{甘油}(\mu\text{g/g 重量}) &= (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div (\text{W} \times \text{V1} \div \text{V}) \times \text{D} \\ &= 368.36 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{W} \times \text{D} \end{aligned}$$

2、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{甘油}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div (500 \times \text{V1} \div \text{V}) \times \text{D} \\ &= 4 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div 500 \times \text{D} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{甘油}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div (500 \times \text{V1} \div \text{V}) \times \text{D} \\ &= 368.36 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div 500 \times \text{D} \end{aligned}$$

3、液体中甘油含量计算：

$$\begin{aligned} \text{甘油}(\text{mmol/L}) &= (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{V1} \times \text{D} \\ &= 4 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times \text{D} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{甘油}(\mu\text{g/mL}) &= (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{V1} \times \text{D} \\ &= 368.36 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times \text{D} \end{aligned}$$

C 标准---4mmol/L=4μmol/mL=368.36μg/mL；

V---提取液体积，1mL；

V1---样本加入体积，0.01mL；

V2---标准品加入体积，0.01mL；

500---细胞数量，百万；

D---稀释倍数,未稀释即为 1；

W---样本取样质量，g。