

甘油 (Glycerol) 含量测定试剂盒说明书

(分光法 48 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(H_2O_2), (H_2O_2)与 4-氨基氨替吡啶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 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉体 mg×1 支	-20℃ 保存	使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 25mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂三	液体 6mL×1 瓶	4℃ 保存	
标准品	液体 1mL×1 支	4℃ 保存	使用前用水稀释 10 倍即成 4mM 甘油标准品待检测液。

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、台式离心机、可调式移液器、研钵和蒸馏水。

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 (10^4): 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 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 510nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温 (25℃)。

③ 在 EP 管中依次加入:

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		20	
蒸馏水			20

样本	20		
试剂一	80	80	80
试剂二	480	480	500
试剂三	120	120	120
混匀，室温（25℃）避光孵育 30min，将全部液体转移至 1mL 比色皿中于 510nm 处读取各管 A 值（直到 2min 内 A 值变化不超过 0.05）。			

- 【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 20μL+560μL 试剂二+120μL 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

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

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

2、按细胞数量计算：

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

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

3、液体中甘油含量计算：

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

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

C 标准---4mmol/L=4μmol/mL=368.36μg/mL；

V---提取液体积，1mL；

V1---样本加入体积，0.02mL；

V2---标准品加入体积，0.02mL；

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。