

3-磷酸甘油（Glycerol-3-phosphate, G3P）含量测定试剂盒说明书 （分光法 48 样）

一、产品简介：

3-磷酸甘油(G3P)被甘油磷酸氧化酶(GPO)氧化生成过氧化氢(H₂O₂)，H₂O₂与4-氨基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 | 粉剂 mg×1 瓶 | 4℃保存 | 使用前甩几下使试剂落入底部，再加 1.1mL 蒸馏水，充分震荡溶解 |
| 试剂二 | 液体 30mL×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 | 本标准品即 3-磷酸甘油的浓度为 8mM，稀释 1 倍后成 4mM 用于标准品待检测液。 |

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）、可调式移液枪、离心机、研钵。

四、3-磷酸甘油(G3P)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 可见分光光度计预热 30min，调节波长到 510 nm，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 | | 30 | |
| 样本 | 30 | | |
| 试剂一 | 20 | 20 | 20 |
| 试剂二 | 530 | 530 | 560 |

| 试剂三 | 120 | 120 | 120 |
|---|-----|-----|-----|
| 混匀，室温（25℃）避光孵育 60min，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】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 20 μ L，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。

五、结果计算：

1、按样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{3-磷酸甘油}(\mu\text{mol/g 重量}) &= (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div (\text{W} \times \text{V1} \div \text{V}) \times \text{D} \\ &= 4 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{W} \times \text{D} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{3-磷酸甘油}(\mu\text{g/g 重量}) &= (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div (\text{W} \times \text{V1} \div \text{V}) \times \text{D} \\ &= 864.16 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{W} \times \text{D} \end{aligned}$$

2、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{3-磷酸甘油}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div (500 \times \text{V1} \div \text{V}) \times \text{D} \\ &= 4 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div 500 \times \text{D} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{3-磷酸甘油}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div (500 \times \text{V1} \div \text{V}) \times \text{D} \\ &= 864.16 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div 500 \times \text{D} \end{aligned}$$

3、液体中甘油含量计算：

$$\begin{aligned} \text{3-磷酸甘油}(\text{mmol/L}) &= (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{V1} \times \text{D} \\ &= 4 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times \text{D} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{3-磷酸甘油}(\mu\text{g/mL}) &= (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{V1} \times \text{D} \\ &= 864.16 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times \text{D} \end{aligned}$$

C 标准---4mmol/L=4 μ mol/mL=864.16 μ g/mL；

V---提取液体积，1mL；

V1---样本加入体积，0.03mL；

V2---标准品加入体积，0.03mL；

500---细胞数量，万；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

W---样本取样质量，g。