

甘油含量检测试剂盒说明书

描述：甘油是甘油三酯的水解产物。脂蛋白酯酶能水解血液中的甘油三酯；胰脂酶可以水解食物中的甘油三酯；激素敏感脂肪分解酶能水解脂肪细胞中的甘油三酯。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，但检测更方便。本试剂盒采用甘油磷酸氧化酶法和经典 GPO-Trinder 酶学反应相结合的方法，通过比色法测定液体样本中的甘油含量。经过优化后，操作步骤更加简单，检测线性范围在 **10-1200 μ mol/L**，可靠性和重复性俱佳，适合生物医学、食品实验室检测。

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

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：测定血液、细胞培养基、体液、酒类饮料中的甘油浓度。

组成：

R1 试剂 20 ml

R2 试剂 5 ml

4 mmol/L 甘油标准品 1 ml

4 °C，储存 6个月。

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：

- 1、**酒类、饮品、清澈液体样本：**可直接进行测定，如超过线性范围可用蒸馏水或生理盐水稀释后再测定。
- 2、**培养液：**取不含酚红、无颜色、无血清的细胞培养基，如有细胞碎片应 4°C，12,000g 离心 5min，取上清进行测定。
- 3、**血液：**新鲜抗凝血，4°C，2,000g 离心 5min 得到血浆；非抗凝血，先 4°C 静置 2h 得到血清后，2000g 离心 10min，除去血细胞。将得到的血浆/血清 70°C 加热 10 分钟灭活内源脂肪酶，12,000g 离心 10min，取上清测定或 -20°C 保存。

二、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，立即使用或 4°C 保存 <1 天，变色弃去。

三、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 μ mol/L，通常取其中 4~6 管即可，**注意设置 0 浓度对照反应管。**

四、甘油浓度测定：

1、参见下表进行加样。为使反应时间尽量一致，减小实验误差，可先加入标准品、待测样品，然后再加入工作溶液。（**注意：**当甘油浓度较低时，可将待测样品与工作溶液按照 100 μ l:100 μ l 体积混合，然后再进行测定，但是如果样品体积超过 100 μ l 时将会稀释工作液中酶的浓度，使反应灵敏度下降。如果待测样品浓度超过线性范围，可进行适当稀释，然后根据稀释倍数来计算样品中甘油浓度。）

2、37°C 或 25°C 反应 15 分钟。反应平衡后颜色在 60 分钟定。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-R² 值-。

表一：

酶标微板测定的加样比例（检测范围 10-1200 $\mu\text{mol/L}$ ）

（可对样品和工作液比例进行微量调整）

	低浓度甘油样品测定			高浓度甘油样品测定		
	空白管	标准品	样本管	空白管	标准品	样本管
蒸馏水 μl	50			5		
标准品 μl		50			5	
样品 μl			50			5
工作液 μl	150	150	150	195	195	195

表二：

1 ml 比色杯测定的加样比例（检测范围 10-1200 $\mu\text{mol/L}$ ）

	低浓度甘油样品测定			高浓度甘油样品测定		
	空白管	标准品	样本管	空白管	标准品	样本管
蒸馏水 μl	200			50		
标准品 μl		200			50	
样品 μl			200			50
工作液 μl	600	600	600	750	750	750

说明：

- 1、维生素 C>0.18g/L、血红蛋白>2g/L、胆红素>0.25g/L、二硫苏糖醇、巯基乙醇、高浓度 EDTA 干扰测试。
- 2、正常血清甘油浓度为 20-130 $\mu\text{mol/L}$ ，细胞培养时须用不含酚红的无色无血清培养基，如果培养基中含有酚红，可以选择含有酚红的无细胞培养基作为对照进行测定。