

甘油三酯 (triglyceride, TG) 含量测定试剂盒说明书

(微板法 96 样)

一、产品简介:

甘油三酯 (TG) 是三分子长链脂肪酸和甘油形成的脂肪分子, 不仅是细胞膜的主要成分, 也是重要呼吸底物。

甘油三酯 (TG) 被脂蛋白脂肪酶水解为甘油和游离脂肪酸。甘油接着被甘油激酶(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-氨基氮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 TG 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	粉剂 mg×1 支	4℃保存	使用前甩几下使试剂落入底部, 再加 2.2mL 蒸馏水, 充分震荡溶解备用。
试剂二	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	使用前甩几下使试剂落入底部, 再加 2.1mL 蒸馏水, 充分震荡溶解备用。
试剂四	液体 6mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	液体 1mL×1 支	4℃保存	

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、可调式移液枪、水浴锅、离心机、研钵、蒸馏水。

四、甘油三酯 (TG) 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】: 若组织样本为高脂样本或部分为高脂样本, 需用无水乙醇进行提取。

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℃或室温离心 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 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 试剂一和二和三可按照 20:80:20 比例配成混合液 (一枪加 120μL 该混合液) (该混合液用多少配多少, 现配现用)。

④ 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		20	
样本	20		
试剂一	20	20	20
试剂二	80	80	100
试剂三	20	20	20
试剂四	60	60	60
混匀，室温（25℃）避光孵育 30min，于 510nm 读取各管 A 值。			

- 【注】1. 若测定管的 A 值大于 0.3，则可将样本进行稀释（用提取液稀释）或减少样本加样量 V1（如减至 10μL，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. 若样本为血清，蛋黄（需用乙醇提取）等高 TG 样本，可把样本 V1 降为 2.5μL，另用 17.5μL 蒸馏水补齐，再按照上述加样表操作测定，则改变后的 V1 需带入公司计算。
3. 若样本自身含有高的甘油背景值或含有高的抗氧化物质（如 VC 等），可增设一个样本自身对照（即 20μL 样本+20μL 蒸馏水+80μL 试剂二+20μL 试剂三+60μL 试剂四）；或若样本自身颜色为红色，也可增设一个样本自身对照（即 20μL 样本+80μL 试剂二+40μL 蒸馏水+60μL 试剂四）；接着均避光反应 20min,510nm 读取吸光值 A，（A 测定-A 对照）代入公式计算。
4. 若 A 测定-A 空白的值小于 0.01，则可增加样本加样量 V1（如由 20μL 增至 50μL，则试剂二相应减少），则改变后的 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：

$$\text{TG}(\mu\text{g/g 重量}) = (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div (\text{W} \times \text{V1} \div \text{V}) \times \text{D} \\ = 500 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{W} \times \text{D}$$

2、按细胞数量计算：

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

3、液体中 TG 含量计算：

$$\text{TG}(\mu\text{g/mL}) = (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{V1} \times \text{D} \\ = 500 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times \text{D}$$

$$\text{TG}(\text{mmol/L}) = (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{V1} \div \text{Mr} \times \text{D} \\ = 0.782 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times \text{D}$$

C 标准---标品浓度，0.5mg/mL=500μg/mL；

Mr---甘油三酯分子量，639；

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；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

500---细胞数量，万；

W---样本取样质量，g。