

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-氨基氨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 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°C 保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	4°C 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°C 保存	
试剂三	粉剂 mg×1 支	-20°C 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°C 保存	
标准品	液体 1mL×1 支	4°C 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°C 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°C 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°C）。

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		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+100μL 试剂二+20μL 试剂三+60μL 试剂四, 避光反应 20min, 510nm 读取吸光值 A), 测定管减去对照管, 代入计算公式计算。
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:

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

$$= 500 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times \text{D}$$

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

$$= 0.782 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times \text{D}$$

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。