CheKine™ 甘油含量检测试剂盒（微量法）

货号: KTB2201　　规格: 48 T/48 S　96 T/96 S　　批号：见产品标签

≠	**检测范围：**31.25-2000 nmol/mL		**灵敏度：**31.25 nmol/mL
	适用样本：动植物组织、细胞、血清（浆）或其他液体		
	保质期：-20℃，避光保存 6 个月		

01 背景与原理

甘油是动植物组织以及血液中甘油三酯代谢的中间产物，甘油三酯经过水解产生甘油，甘油再进一步氧化为细胞代谢提供能量，因此，甘油含量是甘油三酯水解反应的可靠检测指标，检测更加方便。

本试剂盒检测原理是甘油在 ATP 存在下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；在过氧化氢酶作用下生色底物转化为苯醌亚胺，在 505 nm 处有吸收峰，通过测定该波长吸光度即可计算甘油的含量。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Reagent Ⅰ	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20℃，避光保存
Reagent Ⅱ	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4℃，避光保存
Reagent Ⅲ	15 mL	30 mL	4℃
Standard	1 mL	1 mL	4℃，避光保存

***请在实验前检查各组分的量。**

***各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行标准曲线制作或预实验。**

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 505 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通透明板
试剂	去离子水、PBS、异丙醇	稀释标准品/清洗样本/提取样本、检测用
其他	恒温箱、水浴锅、低温离心机、1.5 mL 离心管、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- **正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。**
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。因异丙醇会导致蛋白变性，样本需另行用去离子水按照步骤提取。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 建议实验者自行建立标准曲线以提高结果准确度。如未自行建立标准曲线，可参考结果展示部分的典型标准曲线公式进行结果计算。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，**请在实验全程做好生物安全防护**，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

05-1-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Working Reagent Ⅰ	临用前配制；48 T 加入 7 mL Reagent Ⅲ，96 T 加入 14 mL Reagent Ⅲ，充分溶解待用	未用完的试剂-20℃避光分装保存 1 个月，避免反复冻融。
Working Reagent Ⅱ	临用前配制；48 T 加入 7 mL Reagent Ⅲ，96 T 加入 14 mL Reagent Ⅲ，充分溶解待用	未用完的试剂 4℃避光保存 1 个月
Reagent Ⅲ	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Standard	即用型；使用前平衡到室温	2 μmol/mL 甘油标准品；4℃避光保存

05-1-2 标准品配制

使用 2 μmol/mL 甘油标准品，按照下表所示，进一步稀释标准品。每次实验都要做一次标准品检测，制作标曲；稀释后的标准品溶液不稳定，必须在 4 小时内使用。

序号	标准品（μL）	去离子水（μL）	浓度（nmol/mL）
1	200 μL of 2 μmol/mL	0	2000
2	100 μL of 2000 nmol/mL	100	1000
3	100 μL of 1000 nmol/mL	100	500
4	100 μL of 500 nmol/mL	100	250
5	100 μL of 250 nmol/mL	100	125
6	100 μL of 125 nmol/mL	100	62.5
7	100 μL of 62.5 nmol/mL	100	31.25
空白	0	100	0

05-2 样本制备

注意：建议使用新鲜样本。如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月。测定时，应控制解冻的温度和时间。室温环境下解冻时，需在 4 h 内完成样品解冻。

- **动植物组织：**称取约 0.1 g 组织样本，用 PBS 冲洗组织，滤纸吸干，加入 1 mL 异丙醇，冰浴匀浆，10000 g，4℃离心 10 min，取上清液，置冰上待测。
- **细胞：**收集 5×10^6 个细胞，用冷 PBS 清洗细胞，800 g 离心 2 min，弃上清液。加入 1 mL 异丙醇，冰浴超声波破碎细胞 5 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），10000 g，4℃离心 10 min，取上清液，置冰上待测。
- **血清（浆）等液体样本：**直接检测。

05-3 实验步骤

1. **酶标仪准备**：预热 30 min 以上，调节波长到 505 nm。
2. **Working Reagent 的配制**：临用前配制；将 Working Reagent Ⅰ和 Working Reagent Ⅱ按照 1: 1 的比例混合均匀，现配现用。
3. **检测体系配制**：在 96 孔板中按照如下方式操作，对照孔、空白孔和标准孔只需做 1-2 次：

试剂	空白孔（μL）	标准孔（μL）	对照孔（μL）	测定孔（μL）
样本	0	0	0	20
异丙醇	0	0	20	0
Standard	0	20	0	0
去离子水	20	0	0	0
Working Reagent	200	200	200	200

4. **吸光度检测：**立即混匀，记录 505 nm 处吸光值 A_1，37℃孵育 10 min。迅速取出记录 10 min 时的吸光度 A_2。空白孔记为 $A_{空白}$，标准孔记为 $A_{标准}$，对照孔记为 $A_{对照}$，测定孔记为 $A_{测定}$。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧**二维码**或访问官网[https://www.abbkine.cn]>进入“**技术中心**”>查找“**在线计算器**”**工具**。

06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算$\Delta A_{空白}=A2_{空白}-A1_{空白}$，$\Delta A_{标准}=A2_{标准}-A1_{标准}$，$\Delta A_{对照}=A2_{对照}-A1_{对照}$，$\Delta A_{测定}=A2_{测定}-A1_{测定}$，$\Delta\Delta A_{测定}=\Delta A_{测定}-\Delta A_{对照}$，$\Delta\Delta A_{标准}=\Delta A_{标准}-\Delta A_{空白}$。

2. 标准曲线绘制

以标准品浓度为 y 轴，$\Delta\Delta A_{标准}$为 x 轴，绘制标准曲线。将$\Delta\Delta A_{测定}$代入方程得到 y 值（nmol/mL）。

3. 甘油含量的计算

- 按蛋白浓度计算：

甘油(nmol/mg prot)=$(V_{样}\times y)\div(V_{样}\times Cpr)\times n$**=y÷Cpr×n**

- 按样本鲜重计算：

甘油(nmol/g)=$(V_{样}\times y)\div(W\times V_{样}\div V_{样总})\times n$**=y÷W×n**

- 按细胞数量计算：

甘油(nmol/10^6)=$(V_{样}\times y)\div(N\times V_{样}\div V_{样总})\times n$**=y÷N×n**

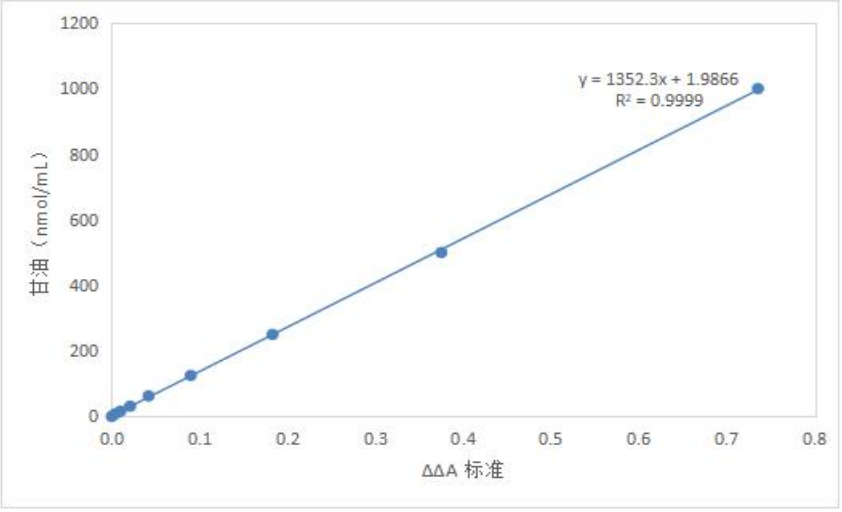
- 按液体体积计算：

甘油(nmol/mL)=$(V_{样}\times y)\div V_{样}\times n$**=y×n**

$V_{样}$：加入反应体系中样本体积，0.02 mL；$V_{样总}$：加入异丙醇体积，1 mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；n：稀释倍数；W：样本质量，g；N：细胞数量，以 10^6 为单位（例如细胞数量为 5×10^6，N=5）。

07 结果展示

典型标准曲线：y=1352.3x+1.9866，R^2=0.9999



示例-1：取 0.109 g 玉米种子，按上述步骤操作，用 96 孔板测得$\Delta\Delta A_{测定}=\Delta A_{测定}-\Delta A_{对照}$=(0.122-0.068)-(0.049-0.049)=0.054，代入方程得 y=75.01，按样本鲜重计算含量得：甘油(nmol/g)**=y÷W×n**=688.17 nmol/g。

08 FAQ

- **检测得到的样本ΔΔA $_{测定}$过高或者过低怎么办?**

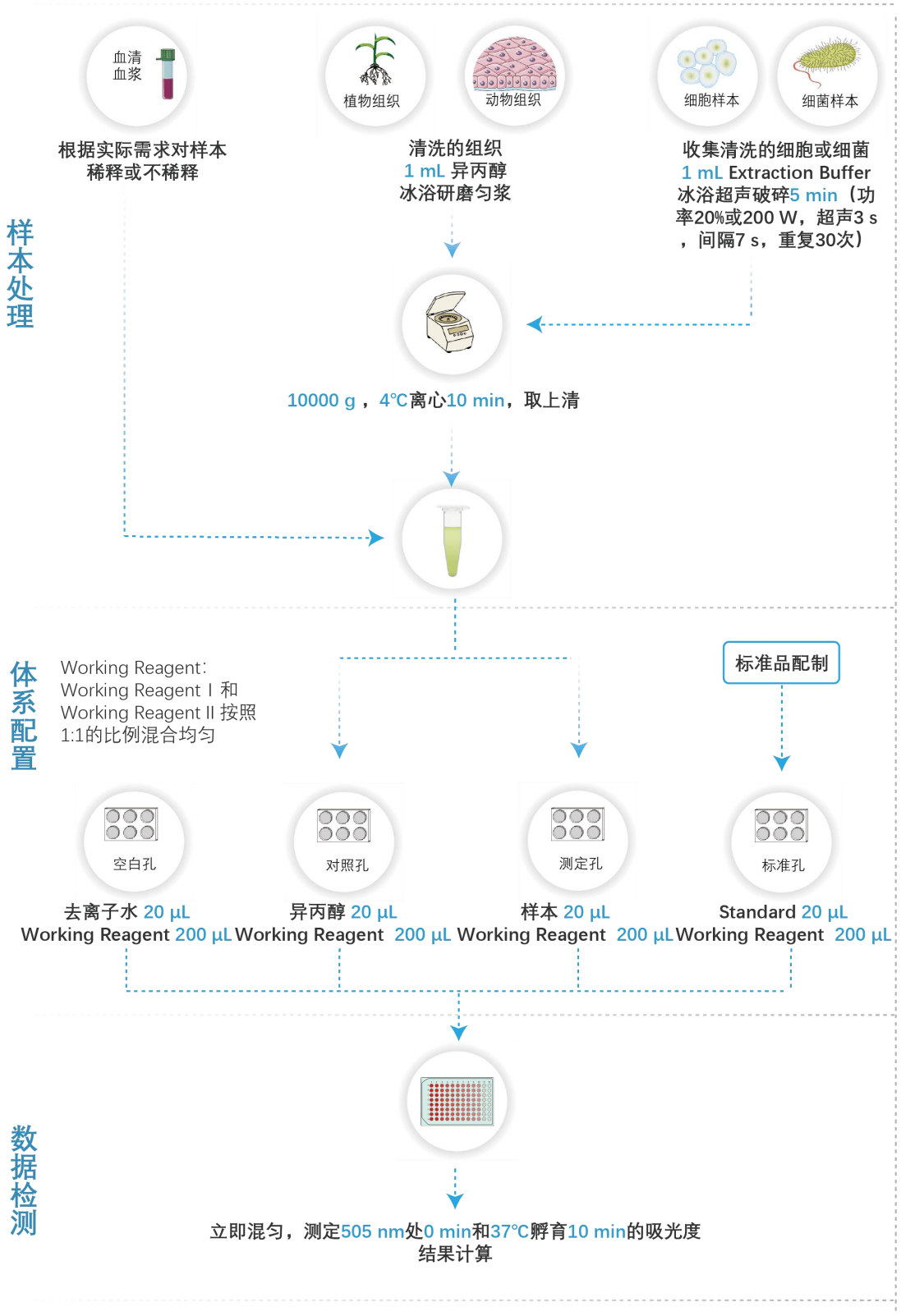
如果样本ΔΔA $_{测定}$>2000 nmol/mL 的ΔΔA $_{标准}$，样本需用异丙醇适当进行稀释后，再进行实验，结果乘以稀释倍数，或减少提取用样本量。如果样本的ΔΔA $_{测定}$<31.25 nmol/mL 的ΔΔA $_{标准}$，可适当提高样本量。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1150	CheKine™ 过氧化物酶（POD）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1030	CheKine™ 超氧化物歧化酶（SOD）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1040	CheKine™ 过氧化氢酶（CAT）活性检测试剂盒（微量法）

CheKine™ 甘油含量检测流程示意图

（Abbkine 货号：KTB2201）



V1.0