

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

(货号: ADS-F-T025 分光法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

3-磷酸甘油(G3P)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 处吸光值即可得出甘油含量。

二、试剂盒的组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 1 支	4℃保存	1. 临用前 8000g 4℃ 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水, 充分震荡溶解; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 6mL×1 瓶	4℃避光保存	
标准品	液体 1mL×1 支	4℃保存	1. 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; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

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 (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、检测步骤:

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°C) 。

③ 在 EP 管中依次加入：

试剂组分 (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°C) 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 20μL，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：

$$\begin{aligned} \text{3-磷酸甘油}(\mu\text{mol/g 重量}) &= (C \text{ 标准} \times V_2) \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div (W \times V_1 \div V) \times D \\ &= 4 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{3-磷酸甘油}(\mu\text{g/g 重量}) &= (C \text{ 标准} \times V_2) \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div (W \times V_1 \div V) \times D \\ &= 864.16 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W \times D \end{aligned}$$

2、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{3-磷酸甘油}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= (C \text{ 标准} \times V_2) \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div (500 \times V_1 \div V) \times D \\ &= 4 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div 500 \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{3-磷酸甘油}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= (C \text{ 标准} \times V_2) \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div (500 \times V_1 \div V) \times D \\ &= 864.16 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div 500 \times D \end{aligned}$$

3、液体中甘油含量计算：

$$\begin{aligned} \text{3-磷酸甘油}(\text{mmol/L}) &= (C \text{ 标准} \times V_2) \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div V_1 \times D \\ &= 4 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{3-磷酸甘油}(\mu\text{g/mL}) &= (C \text{ 标准} \times V_2) \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div V_1 \times D \\ &= 864.16 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times D \end{aligned}$$

4、按蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{3-磷酸甘油}(\mu\text{mol}/\text{mg prot}) &= (C \text{ 标准} \times V_2) \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div (C_{pr} \times V_1 \div V) \times D \\ &= 4 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div C_{pr} \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{3-磷酸甘油}(\mu\text{g}/\text{g prot}) &= (C \text{ 标准} \times V_2) \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div (C_{pr} \times V_1 \div V) \times D \\ &= 864.16 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div C_{pr} \times D \end{aligned}$$

C 标准---4mmol/L=4μmol/mL=864.16μg/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。
Cpr---蛋白浓度 (mg/mL) ; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。