Amplex Red甘油检测试剂盒

产品货号：27052

产品规格：100次

产品简介：

尚宝研发的Amplex Red甘油检测试剂盒(Amplex Red Glycerol Assay Kit)是一种基于探针Amplex Red，利用荧光或吸光度检测，快速、高灵敏地对血清、血浆、组织或细胞样品、尿液、生物体液、组织或细胞培养上清等样品中甘油含量进行检测的试剂盒。本试剂盒仅检测游离甘油的含量，不检测甘油三酯中的甘油含量。

本试剂盒检测灵敏度高，线性范围宽，样品用量少。本试剂盒采用吸光度检测时，在20-500μM浓度范围内有良好的线性关系；采用荧光检测时，在2-200μM浓度范围内有良好的线性关系。使用本试剂盒进行荧光法检测时，检测灵敏度会显著提高，可以使用更少量的样品。

本试剂盒检测方法灵活，检测速度快，适用范围广。本试剂盒不仅可以用荧光检测，也可以用吸光度检测，荧光检测比吸光度检测灵敏度约高10倍。整个检测过程约30分钟即可完成。本试剂盒可用于小鼠、大鼠、人等的血清、血浆、组织或细胞样品、尿液、组织或细胞培养上清等样品的检测。本试剂盒不仅适合少量样本的检测，也非常适合高通量筛选(High-throughput screening)的自动化操作系统。

本试剂盒特异性高。本试剂盒可以排除样品中甘油-3-磷酸(Glycerol-3-phosphate)和过氧化氢(H_2O_2)对于甘油检测的干扰，使检测结果更加准确。

甘油(Glycerol, Glycerin or Glycerine)，又称丙三醇，是一种无色、无臭、味甜的澄明黏稠液体。甘油的分子式为$C_3H_8O_3$，分子量为92.09。甘油的化学结构与碳水化合物不同，不属于同一类物质。每克甘油完全氧化可产生4千卡热量，甘油经人体吸收后通常不会改变血糖和胰岛素水平。甘油是食品加工业中通常使用的甜味剂和保湿剂，大多出现在运动食品和代乳品中。由于甘油可以增加人体组织中的水分含量，所以可以增强高热环境下人体的运动能力。甘油被广泛用于食品、饮料、溶剂、药物和化妆品等的生产，因此其定量在研发中重要意义。

甘油是甘油三酯的主要组成部分，是脂肪最重要的储存方式，也是能量代谢的氧化和合成过程中产生的一种重要的代谢物。当人体摄入脂肪时，大部分脂肪经胆汁乳化成小颗粒，胰腺和小肠内分泌的脂肪酶将脂肪里的脂肪酸水解成游离脂肪酸和甘油单酯。甘油单脂和长链脂肪酸被吸收后，在小肠细胞中重新合成甘油三酯。在生理条件下，甘油三酯通过脂酶(Lipolysis)的水解作用生成甘油和游离脂肪酸(Free fatty acids, FFA)并释放进入血液。生成的甘油不能像脂肪酸一样被脂肪组织再次吸收利用，所以血液中的甘油和游离脂肪酸水平都是非常有效的衡量脂解水平的重要指标，也是很多相关药物研发过程中重要的指标。

本试剂盒中的Amplex Red是一种对H_2O_2高度敏感的荧光探针。在辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP)存在的情况下，Amplex Red能与H_2O_2 1:1反应，产生强烈的红色荧光物质试卤灵(Resorufin)。试卤灵的最大激发波长为571nm，最大发射波长为585nm，并且在激发波长处有很强的可见光吸收。因此本试剂盒可以用荧光和吸光度两种方法来进行检测。

本试剂盒的检测原理如图1所示。在ATP存在的情况下，甘油(Glycerol)被甘油激酶(Glycerol kinase, GK)磷酸化为甘油-3-磷酸 (Glycerol-3-phosphate)，生成的甘油-3-磷酸再在甘油磷酸氧化酶(Glycerol phosphate oxidase, GPO)的作用下和氧气发生氧化反应生成磷酸二羟丙酮(Dihydroxyacetone phosphate, DHAP)和H_2O_2，再通过检测H_2O_2与Amplex Red的反应产物试卤灵的荧光强度或吸光度来最终检测甘油的含量。试卤灵的荧光强度和吸光度与样品中甘油的含量成正比。

① Glycerol + ATP $\xrightarrow{GK}$ Glycerol-3-phosphate + ADP

② Glycerol-3-phosphate + O_2 $\xrightarrow{GPO}$ DHAP + H_2O_2

③ H_2O_2 + Amplex Red $\xrightarrow{HRP}$ Resorufin (Fluorescent)

扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd
地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号
电话：400-611-0007 13671551480
Q Q：807961520
邮箱：saintbio@126.com
http://www.saint-bio.com

图1. Amplex Red甘油检测试剂盒检测甘油的原理图。

本试剂盒提供了甘油标准溶液，可以通过设置标准曲线，从而计算出样品中的甘油含量。本试剂盒对甘油标准品的检测效果参考图2。

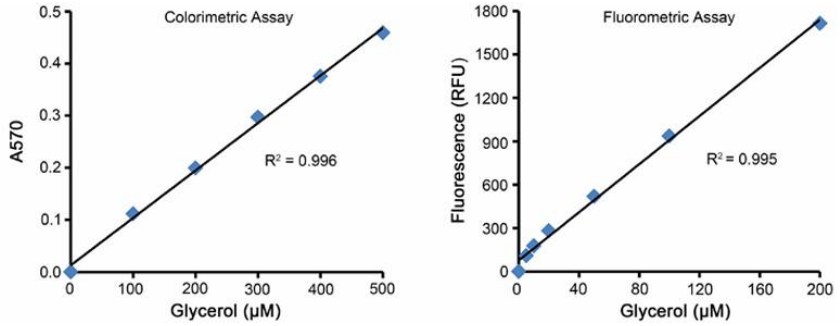


图2. Amplex Red甘油检测试剂盒检测甘油的标准曲线。左图为吸光度检测，右图为荧光检测。图中为37ºC避光反应60分钟的检测数据，反应30分钟数值会略低。实测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

按照使用说明操作，本试剂盒可以进行100次检测。

产品组成：

产品名称	规格	保存条件
甘油检测缓冲液	15ml	-20℃
Amplex Red	200μl	-20℃，避光
甘油激酶	200μl	-20℃
酶混合物	200μl	-20℃，避光
Cofactor	200μl	-20℃
甘油标准溶液(10mM)	200μl	-20℃

使用说明：

1. 样品的准备：

a. 血液样品的准备：对于血清样品，将全血在常温如25ºC下放置30分钟至2小时，不要剧烈摇晃以免溶血，待全血自然凝固并析出血清后，4ºC约1000-2000×g离心10分钟，取黄色上清即得血清，注意不要吸取白色或淡黄色沉淀；对于血浆样品，将全血用肝素或者EDTA进行抗凝，4ºC约1000-2000×g离心10分钟，取黄色或淡黄色上清即得血浆，注意不要吸取白色沉淀。血清和血浆都需置于冰上，如果不能立即检测，也可以分装并短期保存于-20ºC或-80ºC。对于冻存的样品，在检测前解冻后冰浴存放备用，使用前必须混匀。

b. 细胞或组织样品的准备：对于培养的贴壁细胞，PBS洗涤一次并吸净残留液体。对于培养的悬浮细胞，先适当离心（如100-500×g, 5分钟)收集细胞到离心管内，弃上清并吸净残留液体。按照每20-100万细胞加入100-200μl的比例加入异丙醇，适当吹打。对于贴壁细胞适当吹打使细胞脱离培养器皿并转移至离心管中。对于组织样品，按照每10-20mg组织加入 100-200μl的比例加入异丙醇。对于培养的细胞和组织，推荐把体积控制在100-200μl使用高通量组织研磨仪（1.5/2ml×48）、手持式组织研磨仪或玻璃匀浆器在约4ºC或冰浴等低温条件下进行匀浆；也可以考虑把体积放大到400-500μl左右，采用瓷珠机械震荡的方式进行匀浆；或者也可以使用常规的玻璃匀浆器进行匀浆(建议尽量使用较小的玻璃匀浆器，以便于把样品的体积控制在较小体积范围内)。4ºC约12,000×g离心3-5分钟，取上清用于后续检测。

注1：异丙醇制备的样品使用检测缓冲液至少稀释5倍后(即50μl待测样品中异丙醇的含量不高于20%)再用于后续检测。

注2：以上所有操作均需在4ºC或冰上操作。制备好的细胞或组织样品如果不能立即检测，可以-20ºC或-80ºC冻存。

注3：异丙醇容易挥发，由于操作时间过长导致异丙醇的挥发，后续可以将异丙醇补足至初始体积，然后再进行样品

的检测；所有样品的挥发程度接近的情况下，可以统一不再补足挥发掉的异丙醇，但计算样品中的浓度时需要考虑到挥发掉的异丙醇的体积。

c. 细胞培养上清样品的准备：对于贴壁细胞，直接吸取培养液；对于悬浮细胞，离心后吸取培养液。

2. 试剂盒的准备：

a. 融解甘油标准溶液(10mM)和检测缓冲液，平衡至室温后混匀备用。其它试剂存放于冰浴备用，使用完毕后宜立即按照试剂盒要求的条件保存。

b. 甘油检测工作液(Working Solution)的配制：按照每个检测反应80μl的体积配制适量的甘油检测工作液。均匀混合72μl检测缓冲液(Glycerol Assay Buffer)、2μl Amplex Red、2μl甘油激酶(Glycerol Kinase)、2μl酶混合物(Enzyme Mix)、2μl Cofactor，即可配制成80μl甘油检测工作液。根据待检测样品(包括标准品)的数量，配制适量的甘油检测工作液。具体配制方法参考下表。配制好的检测工作液如果置于4ºC或冰浴避光保存，可以在当天使用，但建议尽量现配现用。

Samples	1	10	20	50
Glycerol Assay Buffer (μl)	72	720	1440	3600
Amplex Red (μl)	2	20	40	100
Glycerol Kinase (μl)	2	20	40	100
Enzyme Mix (μl)	2	20	40	100
Cofactor (μl)	2	20	40	100
Working Solution (μl)	80	800	1600	4000

注：由于酶溶液的用量较少且易沉降，必须注意在使用前先轻轻离心一下，然后适当混匀后再使用。

3. 样品测定：

a. 甘油标准曲线设置(吸光度检测或荧光检测，可选取其中的一种，对于样品量较少的情况，优先推荐采用荧光检测)

1) 吸光度检测：取10μl甘油标准溶液(10mM)，加入190μl检测缓冲液(如果检测异丙醇制备的细胞或组织样品，也可以更加精准地使用和样品中异丙醇含量相同的检测缓冲液，但20μl标准品中异丙醇的含量不得超过50%)，混匀，配制成浓度为500μM的甘油标准溶液。分别取500μM的甘油标准溶液0、4、8、12、16、20μl加入96孔板的标准品孔中，并用检测缓冲液或含适量异丙醇的检测缓冲液补足到20μl，此时，标准曲线的浓度分别为0、100、200、300、400、500μM。

注：吸光度检测时建议使用透明96孔板。

2) 荧光检测：取4μl甘油标准溶液(10mM)，加入196μl检测缓冲液(如果检测异丙醇制备的细胞或组织样品，也可以更加精准地使用和样品中异丙醇含量相同的检测缓冲液，但20μl标准品中异丙醇的含量不得超过50%)，混匀，配制成浓度为200μM的甘油标准溶液。分别取200μM的甘油标准溶液0、1、2、5、10、20μl加入96孔板的标准品孔中，并用检测缓冲液或含适量异丙醇的检测缓冲液补足到20μl，此时，标准曲线的浓度分别为0、10、20、50、100、200μM。

注：荧光检测时建议使用96孔黑板。

b. 加入1-20μl稀释后的样品到96孔板样品孔中，并相应地再加入检测缓冲液至样品孔中，补足到20μl。同时设置仅含检测缓冲液或含适量异丙醇的检测缓冲液的孔为空白对照。

注：为确保数值在标准曲线范围内，建议将样品同时设定多个稀释倍数。可以进行预实验确定样品的大致浓度，如果数值不在标准曲线范围内，请调整样品的稀释倍数或者样品的量。样品总稀释倍数记录为n (包括步骤1b中的稀释倍数。例如1b中的稀释倍数为5，本步骤中又对样品进行了10倍稀释，加入的“稀释后的样品”为4μl，则n=5×10×20/4=250)。注意：用异丙醇制备的细胞或组织样品，检测时20μl样品中的异丙醇含量不能超过50%，即相当于最终检测体系中的浓度不会超过10%。

c. (选做)甘油-3-磷酸或过氧化氢的存在会对甘油的检测产生干扰，如果样品中含有甘油-3-磷酸或过氧化氢，须同时设置样品背景对照孔，具体设置方法同步骤3b，并在步骤3d时不加入步骤2b正常配制的甘油检测工作液，而是加入未添加甘油激酶(用相同体积的检测缓冲液替代甘油激酶)的“甘油检测工作液”。

d. 每孔加入甘油检测工作液80μl，混匀，37ºC避光反应30分钟。

注1：如果样品中甘油的含量较高，可适当缩短反应时间，例如反应15或20分钟；如果由于样品中甘油含量偏低而导致吸光度偏低或荧光偏弱，可适当延长反应时间，例如反应60或90分钟，此时检测灵敏度会提高，但标准曲线的高浓度孔会超出线性范围，对于不在线性范围的高浓度点在计算时可以舍去。

注2：样品背景对照孔请加入未添加甘油激酶(用相同体积的检测缓冲液替代甘油激酶)的‘‘甘油检测工作液’’。

e. 如果使用吸光度检测，测定A570；如果使用荧光检测，设置激发波长为560nm，发射波长为590nm进行荧光强度检测。

f. 建立标准曲线，并计算样品中甘油的浓度(A)，如果样品的背景对照孔信号比较高，样品的信号值需要减去样品背景对照值。

甘油标准曲线可以参考图2，吸光度检测在20-500μM浓度范围内有良好的线性关系，荧光检测在2-200μM浓度范围内有良好的线性关系。甘油浓度的计算公式如下：

$C\ (\mu M) = A \times n$

注：A为步骤3f根据标准曲线确定的甘油浓度(μM)；

n为样品步骤3b中提及的样品总稀释倍数。

也可以根据甘油的分子量92.09计算出质量浓度$(\mu g/ml) = C \times 0.09209$。

注意事项：

1. 本试剂盒如果用于细胞或组织样品的检测，须自备异丙醇。用异丙醇制备的细胞或组织样品，可以用于甘油三酯、甘油、游离脂肪酸、胆固醇和胆固醇酯的检测。当样品为细胞或组织的异丙醇抽提物或溶解物时，应使用甘油检测缓冲液(后续简称检测缓冲液)至少稀释2倍，使20μl样品中的异丙醇含量不高于50%，即相当于总的100μl检测体系中异丙醇的含量不高于10%，此时本试剂盒才能正常工作。
2. 为减少稀释液产生的荧光背景带来的误差，标准品的稀释液应该根据样品制备所用的溶液来定。当样品为异丙醇制备的细胞或组织样品时，可以使用和样品中异丙醇含量相同的检测缓冲液稀释；当样品为血液等其它样品时，宜使用检测缓冲液稀释。
3. Amplex Red在空气中不太稳定，开启后应尽快使用，且在使用过程中一定要注意适当避光。
4. Amplex Red的反应产物在还原剂的存在下会很不稳定，因此最终反应体系中的二硫苏糖醇(DTT)、β-巯基乙醇或类似还原剂的浓度应低于10μM。
5. 请确保反应体系的pH值在7-8之间，否则会影响Amplex Red的稳定性和荧光值。
6. 检测缓冲液需要完全解冻并平衡至室温后再使用，否则会影响检测结果。其它试剂(除甘油标准溶液(10mM)外)使用时应在冰上进行。
7. 血清、血浆等样品如果在4ºC保存，保存时间不得超过2周，否则会影响检测结果的准确性。通常血清样品宜在-20ºC保存，-80ºC保存更佳。
8. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
9. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

保存条件：

-20ºC保存，一年有效。其中Amplex Red、酶混合物须避光保存。

扫一扫 加微信
上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd
地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号
电话：400-611-0007 13671551480
Q Q：807961520
邮箱：saintbio@126.com
http://www.saint-bio.com