

Amplex Red甘油三酯检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
S0219S	Amplex Red甘油三酯检测试剂盒	100次
S0219M	Amplex Red甘油三酯检测试剂盒	500次

产品简介:

- 碧云天研发的Amplex Red甘油三酯检测试剂盒(Amplex Red Triglyceride Assay Kit, or Amplex Red TG 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、以及细胞或组织培养上清样品中甘油三酯含量进行检测的试剂盒。
- **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法检测时, 在0.2-10mM范围内有良好的线性关系; 采用荧光法检测时, 在0.02-5mM范围内有良好的线性关系。使用本试剂盒进行吸光度法检测时灵敏度和常规的吸光度法临床用甘油三酯检测试剂盒的灵敏度相近或略高, 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5-10倍。整个检测过程约90分钟即可完成。本试剂盒可用于大鼠、小鼠、人等的血清、血浆、组织或细胞样品、尿液、生物体液、以及细胞或组织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、甘油-3-磷酸(Glycerol-3-phosphate)和过氧化氢(H₂O₂)对于甘油三酯检测的干扰, 使检测结果更加准确。
- 甘油三酯(Triglyceride, Triacylglycerol, or Triacylglyceride, 简称TG或TAG)又称中性脂肪、甘油三酸酯、三酸甘油酯或三酰甘油, 是由3个分子的长链脂肪酸(Long-chain fatty acids)和1个分子的甘油(Glycerol)酯化形成的脂肪分子, 是体内能量的重要来源。甘油三酯是人体内含量最多的脂类, 约占人体脂类的95%, 大部分组织均可以利用甘油三酯分解产物供给能量, 同时肝脏、脂肪等组织还可以进行甘油三酯的合成, 在脂肪等组织中贮存。甘油三酯是植物油、动物脂肪、低密度脂蛋白(Low-density lipoprotein, LDL)、极低密度脂蛋白(Very low-density lipoprotein, VLDL)中的主要成分, 在脂肪酸的运输过程中起重要作用, 也是能量的重要来源。甘油三酯在一系列脂肪酶的作用下, 分解生成甘油和脂肪酸, 并释放进入血液供其它组织利用。
- 甘油三酯由甘油与脂肪酸酯化而成, 是血脂的主要组成部分, 也是机体重要的供能物质。食物中的甘油三酯在肠道经胰脂酶消化分解, 吸收后重新酯化为甘油三酯, 经淋巴系统进入血液。肝脏是合成甘油三酯的主要场所, 脂肪组织是最大的甘油三酯储存库[1]。高甘油三酯和高胆固醇血症是临床最常见的高脂血症, 已证实与动脉粥样硬化、心肌梗死、脑中风、高血压、糖尿病、肥胖等多种疾病有关[2]。除了血浆甘油三酯外, 组织、细胞中的甘油三酯聚集增加, 也与肥胖、脂肪肝、胰岛素抵抗、能量代谢异常等多种病理过程密切相关[3]。在病理条件下, 各种组织细胞合成和储存的甘油三酯显著增加。血液和组织细胞中甘油三酯含量是生物、医学研究常用的生化指标。
- 本试剂盒中的Amplex Red是一种对H₂O₂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H₂O₂ 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。**甘油三酯(Triglyceride)被脂蛋白脂肪酶(Lipoprotein lipase, LPL)水解成甘油(Glycerol)和脂肪酸(Fatty acids), 生成的甘油在ATP和甘油激酶(Glycerol kinase, GK)的作用下磷酸化为甘油-3-磷酸(Glycerol-3-phosphate)和ADP, 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产生磷酸二羟丙酮(Dihydroxyacetone phosphate, DHAP)和H₂O₂, 再通过检测H₂O₂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三酯的含量。试卤灵的荧光强度和吸光度与样品中甘油三酯的含量成正比。

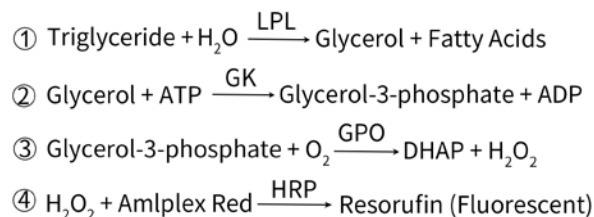


图1. 碧云天Amplex Red甘油三酯检测试剂盒(S0219)检测甘油三酯的原理图。

- 本试剂盒提供了甘油三酯标准溶液, 可以通过设置标准曲线, 从而计算出样品中的甘油三酯含量。本试剂盒对甘油三酯标准品的检测效果参考图2。

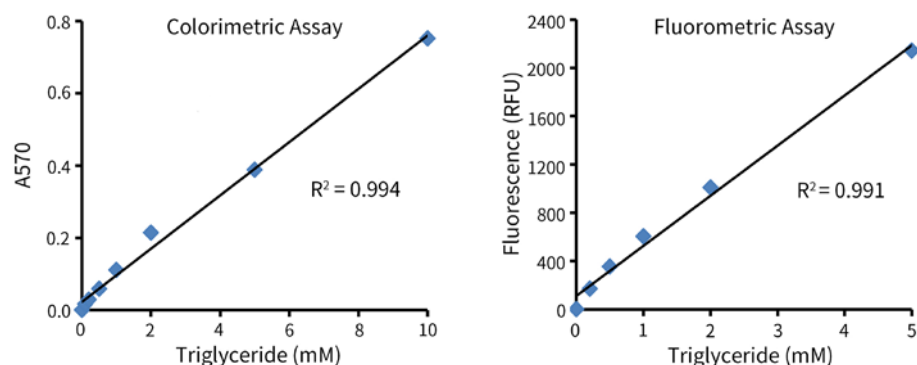


图2. 碧云天Amplex Red甘油三酯检测试剂盒(S0219)检测甘油三酯的标准曲线。左图为吸光度检测，右图为荧光检测。本试剂盒采用吸光度法检测时，在0.2-10mM范围内有良好的线性关系；采用荧光法检测时，在0.02-5mM范围内有良好的线性关系。实测数据会因实验条件、检测仪器的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

➤ 按照使用说明，本试剂盒小包装可以进行100次检测，中包装可以进行500次检测。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
S0219S-1	甘油三酯检测缓冲液	15ml
S0219S-2	Amplex Red	200μl
S0219S-3	酶混合物	200μl
S0219S-4	Cofactor	200μl
S0219S-5	脂酶	200μl
S0219S-6	甘油三酯标准溶液(50mM)	200μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
S0219M-1	甘油三酯检测缓冲液	75ml
S0219M-2	Amplex Red	1ml
S0219M-3	酶混合物	1ml
S0219M-4	Cofactor	1ml
S0219M-5	脂酶	1ml
S0219M-6	甘油三酯标准溶液(50mM)	1ml
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，一年有效。其中Amplex Red、酶混合物须避光保存。

注意事项：

- 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，应使用甘油三酯检测缓冲液(后续简称检测缓冲液)至少稀释5倍，使50μl样品中的异丙醇含量不高于20%，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。
- 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。
- 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。
- 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巯苏糖醇(DTT)、β-巯基乙醇或类似还原剂的浓度应低于10μM。
- 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。
- 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(除甘油三酯标准溶液(50mM)外)使用时应在冰上进行。
- 甘油三酯标准溶液如果有油脂析出会影响后续反应，需要在50-80°C水浴孵育5-20分钟，使甘油三酯标准溶液完全溶解。甘油三酯标准溶液配制在无水乙醇中，由于无水乙醇容易挥发，水浴溶解过程中请注意密封。
- 血清、血浆等样品如果在4°C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-20°C保存，-80°C保存更佳。
- 本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。

➤ 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 样品的准备：

- 血液样品的准备：对于血清样品，将全血在常温如25°C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，4°C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，4°C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-20°C或-80°C。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。
- 细胞或组织样品的准备：对于培养的贴壁细胞，PBS (C0221A)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TissueMaster™高通量组织研磨仪(1.5/2ml×48) (E6618)、TissueMaster™手持式组织研磨仪(E6600)或玻璃匀浆器在约4°C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)。4°C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4°C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-20°C或-80°C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挥发掉的异丙醇的体积。如果样品已经用甲醇/氯仿或者氯仿抽提制备，可以充分干燥后用异丙醇把样品溶解，然后用检测缓冲液至少稀释5倍后再用本试剂盒进行检测。

- 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：

- 融解甘油三酯标准溶液(50mM)和检测缓冲液，平衡至室温后混匀备用。甘油三酯标准溶液(50mM)如果有油脂析出，需要在50-80°C水浴孵育5-20分钟，使甘油三酯标准溶液(50mM)完全溶解。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。
- 甘油三酯检测工作液(Working Solution)的配制：按照每个检测反应50μl的体积配制适量的甘油三酯检测工作液。均匀混合44μl检测缓冲液(Triglyceride Assay Buffer)、2μl Amplex Red、2μl酶混合物(Enzyme Mix)、2μl Cofactor，即可配制成50μl甘油三酯检测工作液。根据待检测样品(包括标准品)的数量，配制适量的甘油三酯检测工作液。具体配制方法参考下表。配制好的检测工作液如果置于4°C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
Triglyceride Assay Buffer (μl)	44	440	880	2200
Amplex Red (μl)	2	20	40	100
Enzyme Mix (μl)	2	20	40	100
Cofactor (μl)	2	20	40	100
Working Solution (μl)	50	500	1000	2500

注：由于酶混合物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. 标准品与样品测定：

- 甘油三酯标准曲线设置(吸光度检测或荧光检测，可选取其中的一种，对于样品量较少或浓度较低的情况，优先推荐采用荧光检测)
 - 吸光度检测：取40μl甘油三酯标准溶液(50mM)，加入160μl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50μl标准品中异丙醇的含量不得超过20%)，混匀，配制成浓度为10mM的甘油三酯标准溶液。分别取10mM的甘油三酯标准溶液0、2.5、5、10、25、50μl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50μl，此时，标准曲线的浓度分别为0、0.5、1、2、5、10mM。
注：吸光度检测时建议使用透明96孔板(FPT010/FPT011)。
 - 荧光检测：取40μl甘油三酯标准溶液(50mM)，加入160μl检测缓冲液(如果检测异丙醇制备的细胞或组织样品，可以使用和样品中异丙醇含量相同的检测缓冲液，但50μl标准品中异丙醇的含量不得超过20%)，混匀，配制成浓度为10mM的甘油三酯标准溶液。分别取10mM的甘油三酯标准溶液0、1、2.5、5、10、25μl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50μl，此时，标准曲线的浓度分别为0、0.2、0.5、1、2、5mM。
注：荧光检测时建议使用96孔黑板(FCP965/FCP966)。
- 加入1-50μl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或含适量异丙醇的检测缓冲液至样品孔中，补足到50μl。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增加样品的量。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25μl, 则 $n=5 \times 10 \times 50/25=100$ 。注意: 用异丙醇制备的细胞或组织样品, 检测时50μl样品中的异丙醇含量不能超过20%, 即相当于最终检测体系中的浓度不会超过10%。

- c. (选做) 甘油、甘油-3-磷酸或过氧化氢的存在会对甘油三酯的检测产生干扰, 如果样品中含有甘油、甘油-3-磷酸(glycerol-3-phosphate)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时用相同体积的检测缓冲液替代脂酶。
- d. 每孔加入脂酶2μl, 混匀, 37°C孵育20分钟。注: 样品背景对照孔请用2μl检测缓冲液替代脂酶。
- e. 每孔加入甘油三酯检测工作液50μl, 混匀, 37°C避光反应60分钟。
注: 如果样品中甘油三酯的含量较高, 可适当缩短反应时间, 例如反应30分钟; 如果荧光强度或吸光度值过低, 也可适当延长反应时间, 例如反应90分钟。
- f. 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。
- g. 建立标准曲线, 并计算样品中甘油三酯的浓度(A), 如果样品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。甘油三酯标准曲线可以参考图2, 吸光度检测在0.2-10mM浓度范围内有良好的线性关系, 荧光检测在0.02-10mM浓度范围内有良好的线性关系。甘油三酯浓度的计算公式如下:

$$C \text{ (mM)} = A \times n$$

注: A为步骤3g根据标准曲线确定的甘油三酯浓度(mM);

n为步骤3b中提及的样品总稀释倍数。

以甘油三油酸酯(Glyceryl trioleate or Triolein)为例, 也可以根据其分子量885.4计算出质量浓度(mg/ml) = $C \times 0.8854$ 。

参考文献:

1. Alves-Bezerra M, Cohen DE. Compr Physiol. 2017. 8(1):1-8.
2. Budoff M. Am J Cardiol. 2016. 118(1):138-45.
3. Packard CJ, Boren J, Taskinen MR. 2020. 11:252.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
C0016/C0017	乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒	100次/500次
C0018	乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(WST-8法)	100次/500次
S0110S	黄嘌呤氧化酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0111S	黄嘌呤氧化酶抑制剂筛选试剂盒(WST-8法)	100次
S0112S	Amplex Red黄嘌呤氧化酶活性检测试剂盒	100次
S0113S	Amplex Red黄嘌呤氧化酶抑制剂筛选试剂盒	100次
S0114S	黄嘌呤/次黄嘌呤检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0204S	D-乳酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0208S	L-乳酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0211S	Amplex Red胆固醇与胆固醇酯检测试剂盒	100次
S0215S	Amplex Red游离脂肪酸检测试剂盒	100次
S0219S	Amplex Red甘油三酯检测试剂盒	100次
S0223S	Amplex Red甘油检测试剂盒	100次
S0227S	Amplex Red乳酸检测试剂盒	100次
S0231S	Amplex Red尿酸与尿酸酶检测试剂盒	100次
S0235S	Amplex Red磷酸盐检测试剂盒	100次
S0239S	Amplex Red乙醇检测试剂盒	100次
S0243S	Amplex Red黄嘌呤/次黄嘌呤检测试剂盒	100次
S0247S	Amplex Red谷氨酸与谷氨酸氧化酶检测试剂盒	100次
S0251S	Amplex Red过氧化氢与过氧化物酶检测试剂盒	100次
S0255S	Amplex Red过氧化氢酶检测试剂盒	100次
S0259S	Amplex Red单胺氧化酶检测试剂盒	100次
S0263S	Amplex Red鞘磷脂酶检测试剂盒	100次
S0267S	Amplex Red胆碱与乙酰胆碱检测试剂盒	100次
S0271S	Amplex Red乙酰胆碱酯酶检测试剂盒	100次
S0275S	Amplex Red磷脂酰胆碱检测试剂盒	100次
S0279S	Amplex Red磷脂酶D检测试剂盒	100次
S0283S	Amplex Red肌酸检测试剂盒	100次
S0287S	Amplex Red肌酸激酶检测试剂盒	100次

S0291S	Amplex Red肌酐检测试剂盒	100次
S0295S	Amplex Red肌酸氨检测试剂盒	100次
S0299S	Amplex Red丙酮酸检测试剂盒	100次
S0303S	Amplex Red丙酮酸激酶检测试剂盒	100次
S0307S	Amplex Red ADP检测试剂盒	100次
S0311S	Amplex Red磷酸烯醇式丙酮酸检测试剂盒	100次
S0315S	Amplex Red丙氨酸检测试剂盒	100次
S0319S	Amplex Red丙氨酸转氨酶检测试剂盒	100次
S0323S	Amplex Red α -酮戊二酸检测试剂盒	100次
S0327S	Amplex Red天冬氨酸检测试剂盒	100次
S0331S	Amplex Red天冬氨酸氨基转移酶检测试剂盒	100次
S0335S	Amplex Red柠檬酸检测试剂盒	100次
S0339S	Amplex Red草酰乙酸检测试剂盒	100次
S0343S	Amplex Red葡萄糖检测试剂盒	100次
S0347S	Amplex Red葡萄糖氧化酶检测试剂盒	100次
S0351S	Amplex Red果糖检测试剂盒	100次
S0355S	Amplex Red乳糖检测试剂盒	100次
S0359S	Amplex Red半乳糖与乳糖检测试剂盒	100次
S0363S	Amplex Red半乳糖与半乳糖氧化酶检测试剂盒	100次
S0367S	Amplex Red麦芽糖检测试剂盒	100次
S0371S	Amplex Red麦芽糖与葡萄糖检测试剂盒	100次
S0375S	Amplex Red糖原检测试剂盒	100次
S0379S	Amplex Red磷酸果糖激酶检测试剂盒	100次
S0383S	Amplex Red乙酰辅酶A检测试剂盒	100次
S0387S	Amplex Red辅酶A检测试剂盒	100次
S0391S	Amplex Red酰基辅酶A合成酶检测试剂盒	100次
S0511S	L-苹果酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0514S	苹果酸脱氢酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0517S	延胡索酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0520S	延胡索酸酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0523S	异柠檬酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0526S	异柠檬酸脱氢酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0529S	Amplex Red琥珀酸检测试剂盒	100次
S0530S	琥珀酸脱氢酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0532S	Amplex Red琥珀酰辅酶A合成酶检测试剂盒	100次
S0535S	支链氨基酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0538S	N-乙酰氨基葡萄糖苷酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0540S	酪氨酸检测试剂盒(显色法)	100次
S0542S	酪氨酸酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0545S	酪氨酸酶抑制剂筛选试剂盒(显色法)	100次
S0547S	髓过氧化物酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0548S	Amplex Red髓过氧化物酶活性检测试剂盒	100次
S0550S	Amplex Red髓过氧化物酶抑制剂筛选试剂盒	100次

Version 2024.02.20