

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号：GBQ042

产品规格：96T(84 samples)

检测仪器：荧光酶标仪(激发波长 535 nm，发射波长 587 nm)

Elabscience®脂肪生成荧光法测试盒

Adipogenesis Fluorometric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于测定组织与细胞样本甘油三脂积累量。

检测原理

甘油三脂通过酶转换后生成水解产物，水解产物在酶催化下生成荧光物质，通过检测荧光值大小，可计算甘油三脂积累量。

检测组织或细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 GBQ162)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	酶工作液 (Enzyme Working Solution)	25 mL×1 瓶	2-8°C 避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	提取液 (Extraction Solution)	50 mL×1 瓶	2-8°C 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	探针(Probe)	0.5 mL × 1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	1 mmol/L 标准品 (1 mmol/L Standard)	0.5 mL × 1 支	2-8°C 避光 保存 6 个月
	96 孔黑色酶标板	1 板	无要求
	96 孔覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 张	

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：荧光酶标仪(激发波长 535 nm，发射波长 587 nm)。

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 显色工作液的配制：

将试剂一：试剂三按49：1体积比进行混匀，现配现用，避光存放。

③ 40 $\mu\text{mol/L}$ 标准品的配制：

将试剂四：试剂二=1：24体积比进行混匀，2-8 $^{\circ}\text{C}$ 避光可存放3天。

④ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥
标准品浓度($\mu\text{mol/L}$)	0	8	16	20	24	32
40 $\mu\text{mol/L}$ 标准品(μL)	0	40	80	100	120	160
试剂二(μL)	200	160	120	100	80	40

样本准备

① 样本处理

细胞样本：

① 收集培养约 1×10^4 个细胞样本，加入实验试剂进行细胞样本处理。

② $600 \times g$ 离心5 min，除去上清，收集细胞，用预冷的PBS缓冲液(2-8°C)清洗细胞样本。

③ 加入200 μ L 试剂二，匀浆，离心后取上清待测，可取部分上清进行蛋白浓度测定。建议用BCA法测蛋白。

④ 上清液90~100°C进行加热30 min，确保脂质完全溶解于试剂二中。冷却至室温待测。(如有浑浊，建议 $10000 \times g$ 离心，取上清进行测定。)

组织样本：

① 用预冷的PBS缓冲液(2-8°C)冲洗组织样本。

② 称量0.02 g组织样本加入180 μ L试剂二匀浆，离心后取上清待测，可取部分上清进行蛋白浓度测定。建议用BCA法测蛋白。

③ 置于冰盒孵育30 min。

④ 上清液90~100°C进行加热30 min，确保脂质完全溶解于试剂二中。冷却至室温待测。(如有浑浊，建议 $10000 \times g$ 离心，取上清进行测定。(组织样本脂质含量较高，建议实验前进行预实验，选择合适的稀释比例进行稀释。稀释液为试剂二)

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：1.4-32 μ mol/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%猪心组织	3-6	10%猪肝组织	8-10
1×10^6 个 CHO 细胞	不稀释	1×10^6 个 293T 细胞	不稀释

注：稀释液为试剂二。

实验关键点

显色工作液配制前需要将配制器具清洗几次，防止杂质污染。

操作步骤

① 标准孔：向酶标板相应孔中加入 20 μL 不同浓度标准品，

测定孔：向酶标板相应孔中加入 20 μL 待测样本。

② 向步骤①各孔中加入 200 μL 显色工作液。

③ 混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 5 min，酶标仪于激发波长 535 nm，发射波长 587 nm 检测各孔荧光值。

操作表

	标准孔	测定孔
待测样本(μL)	--	20
不同浓度的标准品(μL)	20	--
显色工作液(μL)	200	200
混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 5 min，酶标仪于激发波长 535 nm，发射波长 587 nm 检测各孔荧光值。		

检测组织或细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 GBQ162)进行测定。

结果计算

标准品拟合曲线： $y = ax + b$

组织与细胞样本中甘油三脂积累计算公式：

$$\text{甘油三脂积累量} = (\Delta F - b) \div a \div C_{pr} \times f$$

($\mu\text{mol/gprot}$)

注解：

y：标准品荧光值-空白荧光值(标准品浓度为 0 时的荧光值)

x：标准品的浓度

a：标曲的斜率

b：标曲的截距

ΔF ：样本荧光值-空白荧光值(标准品浓度为 0 时的荧光值)

C_{pr} ：待测样本的蛋白浓度，gprot/L

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

附录1 关键数据

1. 技术参数

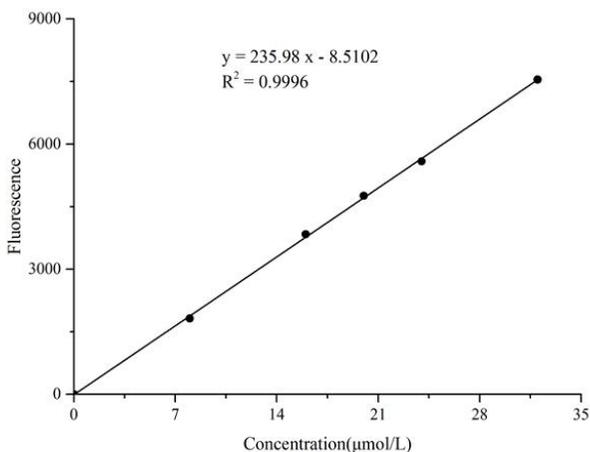
检测范围	1.4-32 $\mu\text{mol/L}$	平均批间差	8.4 %
灵敏度	1.4 $\mu\text{mol/L}$	平均批内差	4 %
平均回收率	98 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度标准品加样量20 μL , 按照操作步骤进行实验, 荧光值如下表所示:

标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	8	16	20	24	32
荧光值	2488	4332	6347	7177	8215	10135
	2395	4189	6213	7226	7840	9835
平均荧光值	2441.5	4260.5	6280	7201.5	8027.5	9985
绝对荧光值	0	1819	3838.5	4760	5586	7543.5

②绘制标曲(如下图):



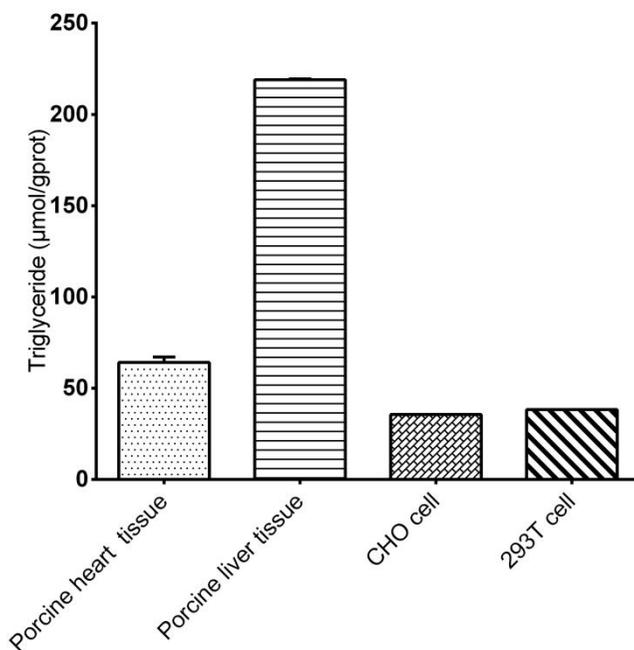
附录2 实例分析

例如检测猪心组织(数据仅供参考):

取10%猪心组织匀浆上清, 稀释5倍, 按说明书进行操作, 结果如下: 标准曲线: $y = 235.98x - 8.5102$, 测定孔的荧光值: 9614, 空白孔荧光值: 2121, 10%猪心组织匀浆上清蛋白浓度2.56 gprot/L计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{甘油三脂积累量} &= (9614 - 2121 + 8.5102) \div 235.98 \div 2.56 \times 5 \\ &(\mu\text{mol/gprot}) \\ &= 62.08 \mu\text{mol/gprot} \end{aligned}$$

按说明书操作, 测定猪心组织匀浆(10%组织匀浆蛋白浓度为2.56 gprot/L, 稀释5倍, 加样量20 μL)、10%猪肝组织匀浆(10%组织匀浆蛋白浓度为5.67 gprot/L稀释5倍, 加样量20 μL)、 1×10^6 个CHO细胞(匀浆蛋白浓度为0.98 gprot/L, 加样量20 μL)、 1×10^6 个293T细胞(匀浆蛋白浓度为1.21 gprot/L, 加样量为20 μL)中的甘油三脂积累量(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
标准曲线线性不合格	配制显色工作液容器中有杂质	清洗容器后再配制显色工作液

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

