

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号：GBQ051

产品规格：48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器：荧光酶标仪(激发波长 535 nm，发射波长 587 nm)

Elabscience®甘油-3-磷酸(G3P)荧光法测试盒 **Glycerol-3-phosphate (G3P) 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

本试剂盒适用于检测组织以及细胞样本中甘油-3-磷酸(G3P)的含量。

检测原理

甘油-3-磷酸(Glycerol-3-phosphate, G3P)又称 3-甘油磷酸、α-磷酸甘油等，细胞中的 G3P 主要来源于糖酵解。G3P 是甘油-3-磷酸穿梭机制中的重要中间物质，研究表明，G3P 参与电子传递，其代谢水平与脂代谢、胰岛素抵抗和某些癌症相关。本试剂盒的作用原理是 G3P 被酶催化分解，其产物在其他酶的作用下与探针生成荧光物质，荧光值越大，样品中 G3P 含量越高。

本试剂盒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 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	20 mL×1 瓶	40 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	酶试剂 (Enzyme Reagent)	液体×1 支	液体×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	探针 (Probe)	0.16 mL×1 支	0.32 mL×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	100 μmol/L 标准品 (100 μmol/L Standard)	1 mL×1 支	2 mL×1 瓶	-20℃ 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(激发波长为 535 nm，发射波长为 587 nm)、37℃ 恒温箱

试剂：双蒸水、0.9% NaCl (生理盐水)

耗材：3 kD 超滤管

试剂准备

① 检测前，试剂二置于冰上待用，其余试剂平衡至室温待用。

② 显色剂的配制：

按试剂一：试剂二：试剂三=1000: 8: 15的体积比配制显色剂，10 min内使用有效，按需配制(建议在样本加入板孔后再配制显色剂)。

③ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(μmol/L)	0	20	40	50	60	70	80	100
100 μmol/L 标准品(μL)	0	40	80	100	120	140	160	200
双蒸水(μL)	200	160	120	100	80	60	40	0

样本准备

① 样本处理

组织样本：按组织样本质量(g)：0.9% NaCl(生理盐水)体积(mL)=1: 9的比例进行匀浆后，将样品在4℃，10000 × g，离心10 min，留取部分上清进行蛋白浓度测定。再取适量上清液加入3 kD的超滤管中，10000 × g，离心15 min后收集滤液待用。

细胞样本：取10⁶个细胞用200 μL 0.9% NaCl(生理盐水)清洗三次。加入200 μL 0.9% NaCl(生理盐水)并吹散细胞，超声破碎或机械匀浆细胞后，样品在4℃，10000 × g，离心10 min，留取部分上清进行蛋白浓度测定。再取适量上清液加入3 kD的超滤管中，10000 × g，离心15 min后取滤液待测。

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：0.19-100 μmol/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%小鼠肝组织	不稀释	1×10 ⁶ 个 293T 细胞	不稀释
10%小鼠脑组织	不稀释	1×10 ⁶ 个 HL-60 细胞	不稀释
10%小鼠心组织	不稀释	1×10 ⁶ 个 Hela 细胞	不稀释
10%小鼠肾组织	不稀释		

注：稀释液为 0.9% NaCl(生理盐水)。

实验关键点

- ① 显色剂需现配现用，10 min 内使用有效，否则背景荧光值过高，影响实验结果。
- ② 样本荧光值过低时可以适当增加样本浓度，样本荧光值过高时可以适当稀释样本。
- ③ 细胞和组织样本需要进行超滤。
- ④ 孵育前，可稍微振荡酶标板使反应试剂混合均匀。

操作步骤

- ① 标准孔：加入 20 μ L 不同浓度标准品；
测定孔：加入 20 μ L 待测样本。
- ② 向各孔中加入 180 μ L 显色剂。
- ③ 37 $^{\circ}$ C 下避光孵育 10 min，荧光酶标仪于激发波长 535 nm，发射波长 587 nm 处检测各孔荧光值。

操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度标准品(μ L)	20	--
样本(μ L)	--	20
显色剂(μ L)	180	180
37 $^{\circ}$ C 下避光孵育 10 min，荧光酶标仪于激发波长 535 nm，发射波长 587 nm 处检测各孔荧光值。		

本试剂盒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： $y = ax + b$

细胞和组织样本中 G3P 含量计算公式：

$$\text{G3P 含量} \quad (\mu\text{mol/gprot}) = (\Delta F - b) \div a \div C_{\text{pr}} \times f$$

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 ：样本测定孔绝对荧光值， $\Delta F = F_{\text{测}} - F_{\text{空}}$

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

C_{pr} ：待测样本的蛋白浓度，gprot/L

附录1 关键数据

1. 技术参数

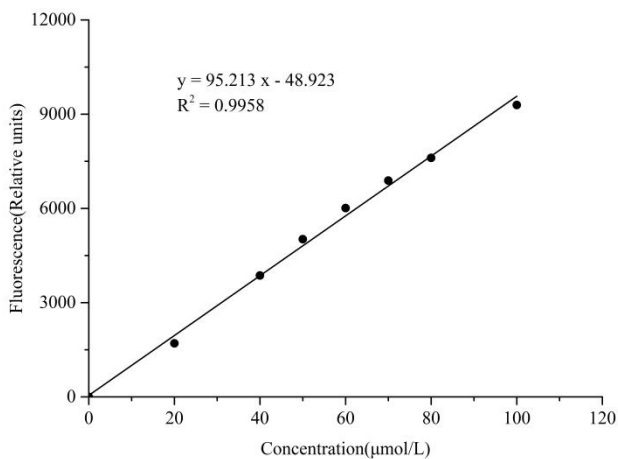
检测范围	0.19-100 $\mu\text{mol/L}$	批内差	0.7-2.8%
灵敏度	0.19 $\mu\text{mol/L}$	批间差	4.6-10.0%
加标回收率	95-104%		

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	20	40	50	60	70	80	100
荧光值	204	1938	4118	5394	6276	7253	7247	9951
	225	1900	4039	5075	6173	6947	8397	9059
平均荧光值	215	1919	4079	5235	6225	7100	7822	9505
绝对荧光值	0	1704	3864	5020	6010	6885	7607	9290

② 绘制标准曲线(如下图)：



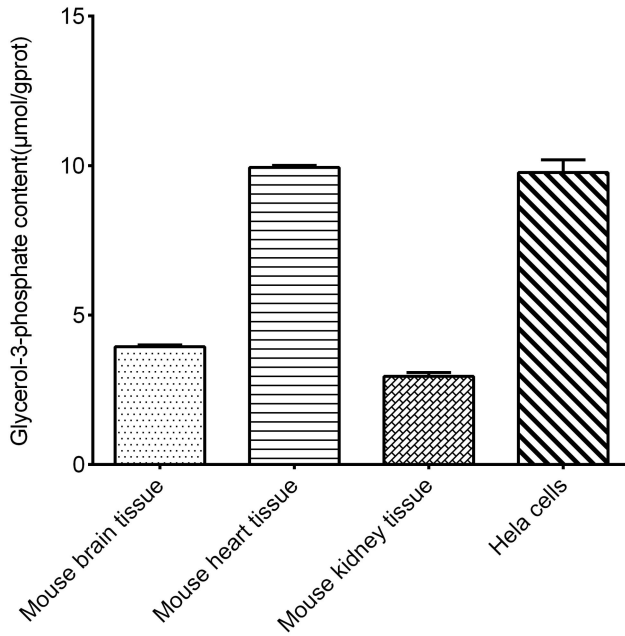
附录2 实例分析

例如检测10%小鼠脑组织匀浆(数据仅供参考):

取20 μL 10%小鼠脑组织匀浆上清液, 按操作表操作, 结果如下: 标准曲线: $y = 79.083x - 119.24$, 测定孔平均荧光值 $F_{\text{测}}$ 为3955, 空白孔荧光值 $F_{\text{空}}$ 为252, $\Delta F = F_{\text{测}} - F_{\text{空}} = 3955 - 252 = 3703$, 10%小鼠脑组织匀浆上清液的蛋白浓度为12.27 gprot/L计算结果为:

$$\text{G3P 含量}(\mu\text{mol/gprot}) = (3955 - 252 + 119.24) \div 79.083 \div 12.27 = 3.94 \mu\text{mol/gprot}$$

按说明书操作, 测定10%小鼠脑组织(组织匀浆蛋白浓度12.2 gprot/L, 加样量20 μL)、10%小鼠心组织(组织匀浆蛋白浓度8.64 gprot/L, 加样量20 μL)、10%小鼠肾组织(组织匀浆蛋白浓度5.85 gprot/L, 加样量20 μL)、Hela细胞(1×10^6 个细胞匀浆蛋白浓度0.40 gprot/L, 加样量为20 μL)中的G3P含量(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
空白值过高	显色剂放置时间过长	显色剂现配现用，尽量在样本加入板孔后配制，配置完迅速加至相应板孔中。
样本值过低	细胞中该物质含量较低	可适当增加细胞浓度。

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。

