甘油三酯测定试剂盒 GPO-PAP 法 (冻干粉型)

Triglyceride Assay Kit GPO-PAP Method (Lyophilized Powder)

许梦瑶, 黄勋*

中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京

*通讯作者邮箱: xhuang@genetics.ac.cn

引用格式: 许梦瑶, 黄勋. (2019). 甘油三酯测定试剂盒 GPO-PAP 法 (冻干粉型). *Bio-101* e1010283.

Doi: 10.21769/BioProtoc.1010283.

How to cite: Xu, M. Y. and Huang, X. (2019). Triglyceride assay kit GPO-PAP method (lyophilized powder). *Bio-101* e1010283. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010283. (in Chinese)

摘要: 甘油三酯 (TAG) 是机体中性脂储存的主要形式, 检测甘油三酯的水平可以反应机体的能量代谢状态 (Liu 等, 2014)。

关键词: 甘油三酯, 脂代谢, 脂肪体 X

材料与试剂

1. 移液枪头
2. 1.5 ml EP 管
3. (可选) 过滤灭菌器
4. 96 孔板
5. 果蝇样本
6. 液氮
7. NaCl
8. KCl
9. Na₂HPO₄
10. KH₂PO₄
11. 甘油三酯测定试剂盒 (GPO-PAP 法) (中生北控)
12. Tween-20 (阿拉丁, catalog number: T104863-100ml)
13. BSA (阿拉丁, catalog number: A104912-100g)
14. Brandford Reagent (Sigma, catalog number: B6916-500ML)

15. 1× PBS 缓冲液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 移液枪
2. 酶标仪
3. 研磨器 (Koktes)
4. -80 °C 冰箱 (Haier)
5. 离心机 (Eppendorf, model: 5415R)
6. Block Heater (Qilin Beier GL-150B)
7. 高压蒸汽灭菌锅

实验步骤

1. 样品准备：无论幼虫还是成虫，均以雌雄分开的方式收集样品 (组织样品需解剖，可以不分雌雄)。每组 3 个重复，每个重复 5~10 只。放入 1.5 ml EP 管后立即放入液氮，速冻后从液氮中取出管子，加入 200 μ l PBST (PBS + 0.05% Tween-20)，将样品用研磨器研磨，可保存在 -80 °C。
2. 正式开始测定实验之前，预冷 4 °C 离心机，将干粉溶于 10 ml 反应溶液。将 -80 °C 冻存样品取出，瞬离样品溶液 (时间不宜长，否则使样品溶液不均匀，影响测定结果)，然后置于冰上。
3. 将上述溶液取出 100 μ l 上清到另一 1.5 ml EP 管 (待测 TAG，剩下 100 μ l 用于测定蛋白) 置于冰上。
4. 用于测定 TAG 的 100 μ l 样品溶液置于 70 °C 反应 10 min。热浴后的样品可重新置于 -80 °C 保存。
5. 将热浴后的样品溶液取出 10 μ l 与 200 μ l 反应溶液。在标准曲线上取 4 个点，分别是 0、0.0125、0.25、2.0 (mg)，各取 10 μ l 于反应溶液。将样品与标准曲线的混合液同时置于 37 °C, 30 min 后取出放室温。
6. 将反应后的溶液室温 12,000 $\times$ g, 2 min 离心。移取离心后的反应溶液各 190 μ l 于 96 孔酶标板中，记录样品位置待酶标仪测定 (Read Plate 540 nm)。

7. 用于测蛋白的 100 μ l 样品溶液 4 $^{\circ}$ C, 12,000 $\times$ g 离心 2 min。取 10 μ l 上清于 200 μ l Bradford Reagent 反应溶液中。配制蛋白标准样: 0、0.0125、0.25、0.5、1、2 mg/ml BSA 溶液, 各取 10 μ l 标准曲线溶液于 200 μ l Bradford Reagent 反应溶液中, 37 $^{\circ}$ C 反应 10 min, 后取出放室温。取 180 μ l 置于 96 孔板中, 酶标仪测定蛋白浓度 (Read Plate 595 nm)。

溶液配方

1. 1 $\times$ PBS 缓冲液

磷酸缓冲盐缓冲液 (PBS)

137 mmol/L NaCl

2.7 mmol/L KCl

10 mmol/L Na₂HPO₄

2 mmol/L KH₂PO₄

用 800 ml 蒸馏水溶解 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄ 和 0.24 g KH₂PO₄。用 HCl 调节溶液的 pH 值至 7.4, 加水至 1 L。分装后在 15 psi (1.05 kg/cm²) 高压蒸汽灭菌 20 min, 或通过过滤除菌, 保存至室温

参考文献

1. Liu, Y., Wang, W., Shui, G. and Huang, X. (2014). [CDP-diacylglycerol synthetase coordinates cell growth and fat storage through phosphatidylinositol metabolism and the insulin pathway](#). *PLoS Genet* 10(3): e1004172.