

甘油含量检测试剂盒 (酶促法) 说明书

货号：1402425

使用前请认真完整阅读说明书！

版本：A/0

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

■ 预期用途

本试剂盒可测定注射液、疫苗等生物制品样品中的甘油含量。试剂盒操作简单，最低检测限为 0.01 mM，有效线性范围 0.2 mM~2.0 mM，可靠性和重复性俱佳。适合生物医学、生物制品、食品实验室检测。

■ 检测原理

甘油与 NAD⁺在甘油脱氢酶的作用下，NAD⁺被还原为 NADH，NADH 量与甘油浓度成正相关；本产品通过在 340 nm 处检测 NADH 来计算样品中甘油的含量。

■ 试剂盒组分

表 1. 试剂盒组分

组分	产品号	装量	储存条件
Assay Buffer I	BNA001	1.5 mL × 5 管	-18 °C 及以下
Assay Buffer II	BNA002	100 μL × 2 管	-18 °C 及以下
Enzyme Mix	BNB001	0.5 mL × 2 管	-18 °C 及以下
100 mM 甘油标准品	BNC001	200 μL × 1 管	-18 °C 及以下

※注：试剂盒未拆包装前储存于-18 °C 及以下，拆封使用后，产品号 BNA001、BNC001 放置 2-8 °C 保存，产品号 BNA002、BNB001 放置-18 °C 及以下保存，且冻融两次后不可再冻融使用。

■ 规格

96 测试/盒。

■ 有效期

规定储存条件下 6 个月，具体详见试剂盒标签。

■ 适用机型（含有波长 340nm 的酶标仪，包含但不限于）

- MD SpectraMax M2/i3
- Thermo Varioskan Flash
- BioTek SynergyMx/2

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- ddH₂O

■ 相关设备

- 迷你离心机
- 涡旋震荡器
- 恒温培养箱
- 1000 μL、100 μL、10 μL 移液器

■ 操作过程

一、样品处理

注射液、疫苗等清澈液体生物制品样品直接测定；如初次测定结果超过本试剂盒线性范围，则需要用 ddH₂O 稀释后再次测定。若需要更高浓度的标准品进行稀释准确性加标回收率验证，可购买国家甘油标准品，货号：190057。高浓度甘油参考品配制可参考湖州申科配制 6 M 甘油参考品方式。

◇ 高浓度甘油参考品配制

- 1、将 15 mL 容量瓶，放在称量天平上，清零；
- 2、缓慢加入国家甘油标准品，称取 8.2881 g 甘油；
- 3、加双蒸水定容至 15 mL，摇晃混匀，终浓度为 6 M，然后转入 15 mL 离心管中保存。

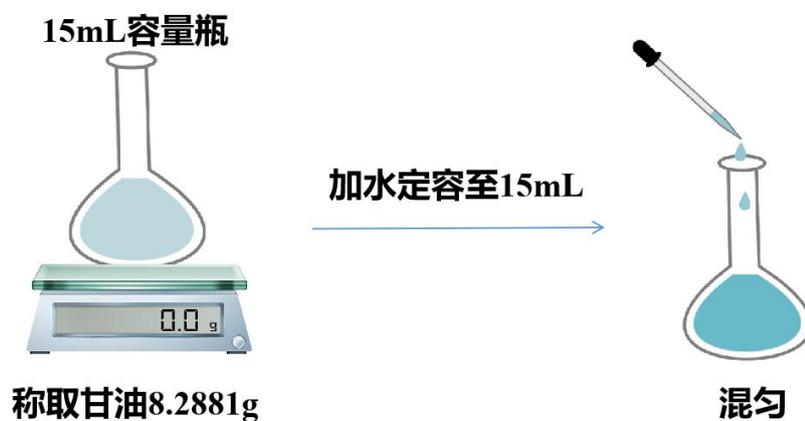


图 1 6 M 甘油配制流程示意图

二、标准品稀释

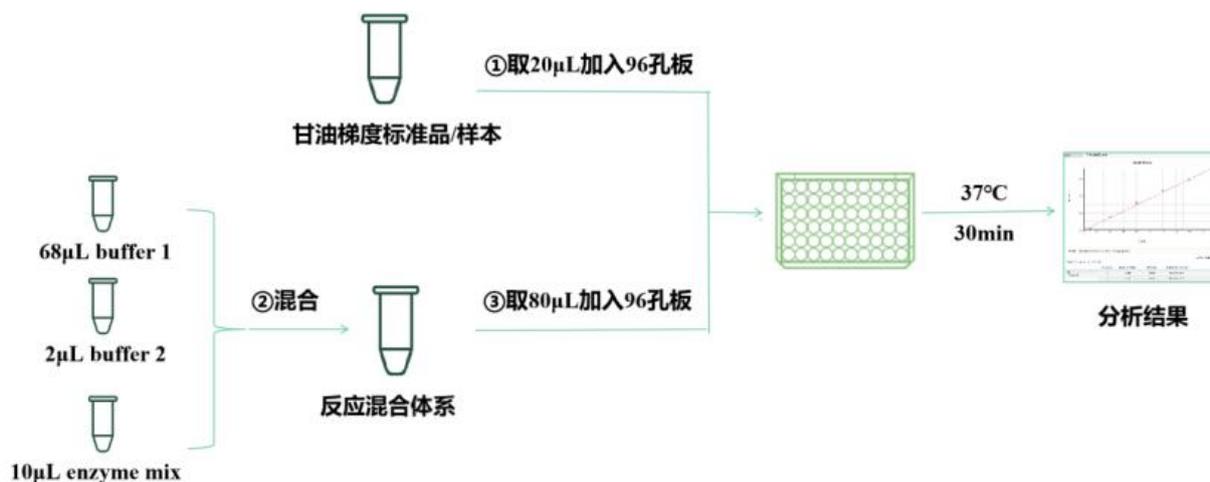
本试剂盒中含有一支甘油标准品，浓度为 100 mM，稀释方案具体如下：

1. 用 ddH₂O 将 100 mM 甘油标准品稀释为 2.0 mM、1.6 mM、1.2 mM、0.8 mM、0.4 mM、0.2 mM、0.1 mM，并设置 0 mM 浓度对照反应管。稀释方案见表 2。

表 2.甘油标准曲线稀释梯度

稀释管	稀释体积	浓度
ST1	20 μL 100 mM 甘油标准品 + 980 μL ddH ₂ O	2.0 mM
ST2	800 μL ST1 + 200 μL ddH ₂ O	1.6 mM
ST3	750 μL ST2 + 250 μL ddH ₂ O	1.2 mM
ST4	600 μL ST3 + 300 μL ddH ₂ O	0.8 mM
ST5	500 μL ST4 + 500 μL ddH ₂ O	0.4 mM
ST6	500 μL ST5 + 500 μL ddH ₂ O	0.2 mM
ST7	500 μL ST6 + 500 μL ddH ₂ O	0.1 mM (锚定点)
空白孔	500 μL ddH ₂ O	0 mM

操作基本流程示意图



三、对照样品处理

1. 样品平行处理：为了确保结果的准确性，建议每个样品平行进行 3 重复检测。
2. 加标回收 (ERC) 用 ERC 来评估甘油检测的真实性和准确度，并可用 ERC 来评估验证分析方法和系统性能。加标回收率计算公式 = (检测值 - 本底值) / 加入甘油量 * 100%。

四、甘油测定

1. 反应液配制

1) 试剂盒未拆封时需要在-18 °C及以下保存; 每次反应需要配制新鲜的反应液, BNA002、BNB001 反复冻融两次后不可再使用。在反应液配制过程中, Assay Buffer II及 Enzyme Mix 需要冰上操作; 具体反应体系如下:

表 3.反应液配制

	Assay Buffer I	Assay Buffer II	Enzyme Mix
体积(μL)	68	2	10

2) 将 20 μL 待测样品及甘油标准品工作液分别加入到 96 孔透明平底板相应孔中, 需分别设置 3 个复孔。

3) 根据表 3 配制反应混合液, 将 80 μL 反应混合液分别加入到每个反应孔中, 置于 37 °C 恒温培养箱孵育 30 分钟, 随后用酶标仪测定其在 340 nm 处的吸光值。

2. 结果判定

1) A₃₄₀ 吸光值的计算

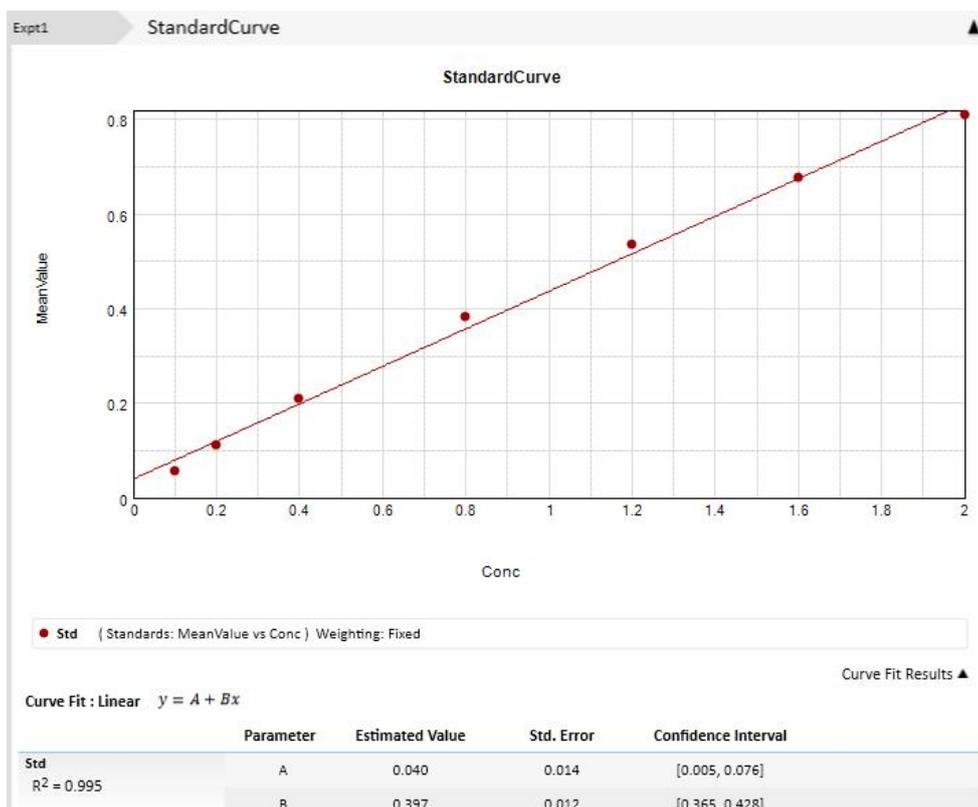
首先用 0 mM 浓度的吸光度值对剩余各标曲浓度及待测样品的吸光值进行调零。

2) 标准曲线的绘制与计算

以标准品各孔 A₃₄₀ 平均值吸光度值为纵坐标 (y), 以对应的甘油标准品浓度 (mM) 为横坐标 (x), 得出直线回归方程, 见下图。标曲拟合范围为 ST1~ST7, 0 值不计入标曲。

即: $y=A+Bx$;

要求标准曲线线性相关系数 $R^2 \geq 0.980$ 。



甘油标准曲线图

(纵坐标为 A_{340} 平均值吸光度值, 横坐标为甘油标准品浓度 mM)

将样品的吸光度值代入标准曲线中, 从标准曲线上读出样品所对应的浓度, 乘以其对应的稀释倍数即为样品中甘油实际残留量。

标曲的拟合软件可以用酶标仪自带的软件。如无, 则建议采用专业的标曲制作软件, 如 Curve Expert, ELISA Calc 等。

■ 产品性能指标 (用户可根据实际样品法规要求制定相应指标)

- ① 定量限: 0.2 mM;
- ② 有效线性范围: 0.2 mM~2.0 mM, 相关系数 $R^2 \geq 0.980$;
- ③ 精密度: 重复性 $CV \leq 15\%$;
- ④ 准确度: 回收率在 80%~120% 范围内。

■ 问题解答

问题	原因	解决方案
实验无结果	使用冷藏的缓冲液	缓冲液在室温下恢复到室温
	波长读数不正确	检查仪器的波长和滤光片设置 (340 nm)
	使用不合适的酶标仪	检测酶标仪是否含有 340 nm 波长
	测定的微量酶标板不合适	选用透明板或者透明板条
样品/标准品 检测值过高与 过低	试剂盒试剂成了解冻不充分	试剂盒使用前所有成分充分融化
	使用过期的试剂盒或不正确储存的试剂	检查有效期限, 并妥善保管试剂盒
	孵育时间或温度不正确	按照说明书中正确的孵育时间和温度
	反应体积与说明书不一致	按照说明书上配制体积进行
检测样品读数 不稳定	样品中存在干扰物质	按照说明书进行稀释, 进行加标回收, 直到加标回收正常
	使用旧的或不适当储存的样品	使用新鲜样品或储存在-80 °C(液氮速冻后)待用
	使用反复冻融的样品	如需多次使用, 可对样品进行等份分装并冻存
结果异常	样品读数超出线性范围	浓缩/稀释样品在线性范围内
	酶标板板中形成了气泡	移液器轻轻地靠在试管壁上加样
	酶标板底有异物	实验前检测微量滴度板底是否有异物, 清除或者弃之
	标准原液浓度不正确	请参考说明书规程上的稀释度

■ 参考文献:

1. Kuhn J, Muller H, Saizig D, et al . A rapid method for an offline glycerol determination during microbial fermentation [J] . Electronic Journal of Biotechnology, 2015, 18(3) : 252 – 255 .
2. 周泽林, 王柱, 王宪斌 . 酶法测定发酵液中甘油含量方法的研究 [J] . 食品与发酵科技, 2014, 50 (4): 72-73 .
3. 骆展鹏, 杨俊鸿, 邹晓萍等 . 甘油残留量检测方法确认 [J] . 国际检验医学杂志 2014, 35 (8): 1039 – 1040 .

生效日期: 2023 年 06 月 20 日

服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

www.shenkebio.com

地址: 浙江省湖州市红丰路 1366 号 6 号楼

Email: Info@shenkebio.com

电话: 0572-2165910