

中文说明书

Glycerol-Glo™ Assay

适用产品目录号：J3150 和 J3151



Glycerol-Glo™ Assay

所有技术文献的英文原版均可在 [www.promega.com/ protocols](http://www.promega.com/protocols) 获得。请访问该网址以确定您使用的说明书是否为最新版本。如果您在使用该试剂盒时有任何问题，请与 Promega 北京技术服务部联系。
电子邮箱: chinatechserv@promega.com

1. 产品描述	2
2. 产品组分和储存条件	4
3. 甘油检测	5
3. A. 用户需提供的材料	5
3. B. 试剂制备	5
3. C. 检测操作步骤	5
4. 实验示例	7
4. A. 脂肪细胞的脂解作用	7
4. B. 其他酶活性测量	9
5. 附录	10
5. A. 信号稳定性	10
5. B. 温度和试剂兼容性	10
5. C. 微孔板和检测仪器	10
5. D. 多重检测和归一化	10
6. 参考文献	11
7. 相关产品	12

1. 产品描述

Glycerol-Glo™ Assay ^(a) 为测量细胞裂解物和其他生物样品如细胞培养基、血清和组织裂解物中的甘油提供了一种发光检测方法。甘油主要作为甘油三酯释放的脂解产物被测量。同时甘油还是多种其他酶促或代谢过程的底物或产物，因此通过 Glycerol-Glo™ Assay 还可研究这些酶促或代谢过程。

Glycerol-Glo™ Assay 利用酶偶联法对甘油进行测量，该方法将 NADH（还原型辅酶 I）的生成与 proluciferin（还原酶底物）的激活联系起来，生成的 luciferin（萤光素）可被萤光素酶催化发光（图 1）。

Glycerol-Glo™ Assay 是生物发光代谢物检测平台的一部分，可对多种样品类型（1-2）进行快速、灵敏的代谢物检测，并且与高通量应用兼容。该检测可在 96 和 384 孔板中进行，检测试剂可被直接添加到样品中，而无需有机萃取，使其更适用于高通量应用（图 2）

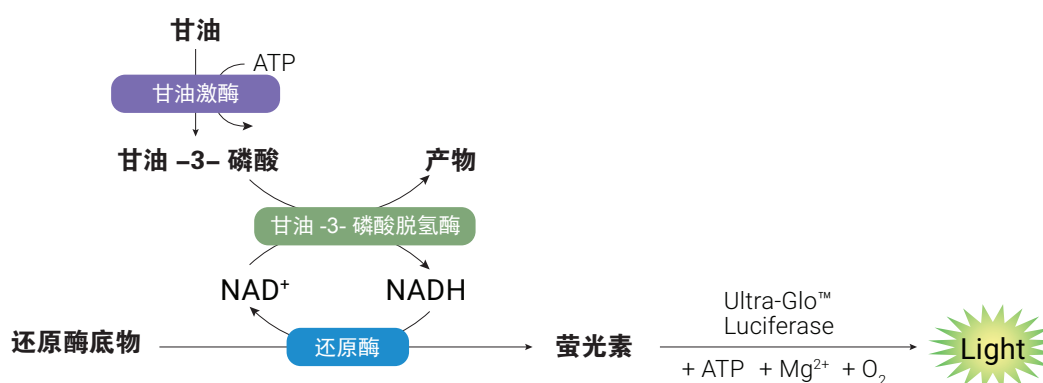


图 1. Glycerol-Glo™ Assay 原理示意图。甘油激酶和甘油-3-磷酸脱氢酶用于产生 NADH。在 NADH 存在的情况下，还原酶将 proluciferin 还原酶底物还原成萤光素。使用 Ultra-Glo™ Luciferase 和 ATP 通过萤光素酶反应对萤光素进行检测，产生的光信号强度与样品中甘油的含量呈正比。

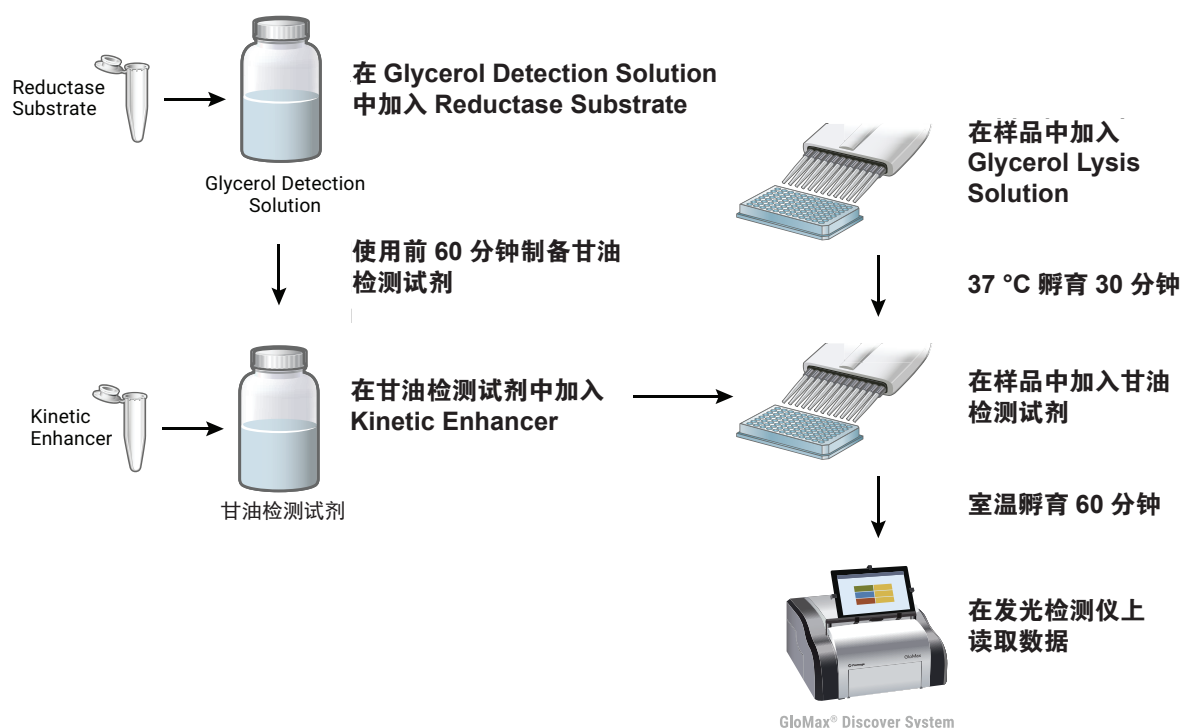


图 2. Glycerol-Glo™ Assay 试剂制备和操作流程。上述操作流程用于甘油测量。

2. 产品组分和储存条件

产品	规格	目录号
Glycerol-Glo™ Assay	5ml	J3150

该系统包含的试剂足够用于在 96 孔板中进行 100 次反应（50μl 样品 + 50μl 甘油检测试剂）。包括：

- 10ml Glycerol Lysis Solution
- 5ml Glycerol Detection Solution
- 55μl Reductase Substrate
- 50μl Kinetic Enhancer
- 500μl Glycerol Standard (20mM)

产品	规格	目录号
Glycerol-Glo™ Assay	50 ml	J3151

该系统包含的试剂足够用于在 96 孔板中进行 1000 次反应（50μl 样品 + 50μl 甘油检测试剂）。包括：

- 100ml Glycerol Lysis Solution
- 50ml Glycerol Detection Solution
- 2×275μl Reductase Substrate
- 500μl Kinetic Enhancer
- 500μl Glycerol Standard (20mM)

储存条件：将完整试剂盒储存于 -65℃ 以下。或者，将 Glycerol Detection Solution 和 Reductase Substrate 储存于 -65℃ 以下，Kinetic Enhancer 储存于 -10℃ 以下，并将 Glycerol Lysis Solution 和 Glycerol Standard 储存在 + 10℃ 以下。试剂盒组分可以冻融 3 次，对检测性能无影响。

⚠ 注意：操作细胞和细胞培养试剂等生物危害性材料时，请使用个人防护装备并遵守所在机构的安全准则和废弃物处置要求。

3. 甘油检测

3.A. 用户需提供的材料

- PBS
- 与标准微孔板读数仪兼容的 96 或 384 孔壁不透光的检测板（底部透明或不透明）
- 单通道和多通道移液器，吸头和试剂加样槽
- 能够读取微孔板的发光检测仪（例如，GloMax[®] Discover, Cat.#GM3000）
- 水浴

3.B. 试剂制备

本操作方法适用于在 96 孔板中使用 50 μ l 制备好的样品和 50 μ l 甘油检测试剂进行反应。该检测还适用于其他体积，只要保持甘油检测试剂体积与样品体积为 1:1 的比例（例如，384 孔板中用 20 μ l 制备好的样品和 20 μ l 甘油检测试剂）。

注意：甘油是许多生物制剂（例如，酶存储缓冲液，培养基，胎牛血清（FBS））中存在的常见实验试剂，其浓度明显高于 Glycerol-Glo[™] Assay 所设计的线性范围。例如，100% 的甘油相当于 13.6M 的浓度，所以即使 0.001% 的污染也会超过检测线性度的上限（80 μ M）。因此，必须小心操作以降低污染风险。

1. 将所有组分在 22 $^{\circ}$ C 水浴中融化并混匀，以确保使用前为均匀的溶液。将 Reductase Substrate 和 Kinetic Enhancer 置于冰上；所有其他组分在使用前可保持于 22 $^{\circ}$ C 中。
2. 确定当前实验所需的试剂量。试剂在制备当天使用；不要储存至下次使用。
3. 制备甘油检测试剂，每毫升 Glycerol Detection Solution 需加入 10 μ l Reductase Substrate 并颠倒混匀。使用前 1 小时制备该试剂，使检测背景降至最低。置于室温。
4. 1 小时后，在每毫升于步骤 3 制备的甘油检测试剂中加入 10 μ l Kinetic Enhancer 并颠倒混匀。

3.C. 检测操作步骤

试剂盒包含 20mM 的 Glycerol Standard 用于制作标准曲线（图 3），以确认样品在检测的线性范围内并计算甘油浓度。如果样品的相对光单位（RLU）值不在甘油标准液曲线的线性范围内，则应调整样品的稀释度并重新测定。使用与制备样品相同的缓冲液制备标准品，并遵循相同的检测操作方法非常重要。例如，如果样品是在 1:1 的培养基：Glycerol Lysis Solution 混合物中制备的，那么标准液也必须在 1:1 的培养基：Glycerol Lysis Solution 混合物中制备。

1. 对于每个样品、标准品或对照：
 - a. 对于培养基、血清和组织匀浆样品：
 - i. 在 Glycerol Lysis Solution 中稀释样品，使甘油浓度低于 80 μ M。将 25 μ l 样品、标准品或对照转移至 96 孔板中。
 - ii. 加入 25 μ l Glycerol Lysis Solution，短暂震荡并于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。

⚠ 注意：如果在溶液中检测甘油（即无需裂解细胞），则无需添加 Glycerol Lysis Solution。确保制备标准品和对照时也不要添加 Glycerol Lysis Solution，并将样品体积补至 50 μ l。

b. 对于贴壁细胞和 3D 培养的细胞：

- i. 从培养细胞的 96 孔板中去除培养基。使用 100 μ l PBS 将细胞洗涤两次。
- ii. 加入 50 μ l Glycerol Lysis Solution，短暂震荡并于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。
- iii. 如果需要，可以在 Glycerol Lysis Solution 中稀释样品，使甘油浓度低于 80 μ M。将 50 μ l 稀释的样品、标准品或对照转移至 96 孔板的空孔中。

2. 在所有孔中加入 50 μ l 于 3.B 中制备的甘油检测试剂。

3. 手动或用微孔板振荡仪低转速摇动孔板 30-60 秒。

4. 室温孵育 1 小时。

5. 使用能够读取微孔板的发光检测仪检测发光信号。

! 注意：光信号会持续增加直至所有甘油被消耗完且信号达到平台期。在任何时间点，信号都与甘油浓度成正比。

6. 通过比较样品和标准品的发光信号计算甘油浓度（见图 3）。

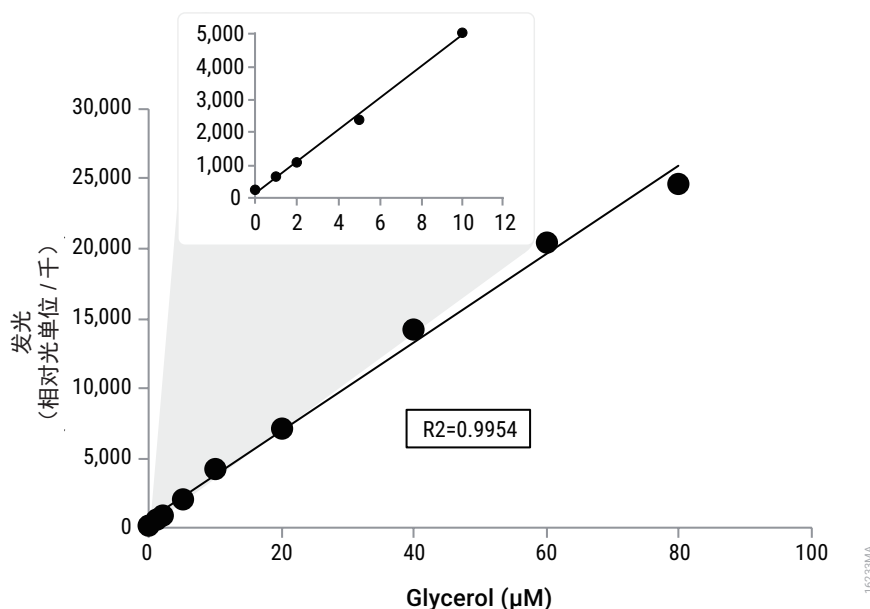


图 3. 甘油标准曲线。将 2 μ l 20mM 的 Glycerol Standard 稀释于 498 μ l Glycerol Lysis Solution 中，接着通过混合 200 μ l 标准品和 200 μ l Glycerol Lysis Solution 进行 2 倍的系列稀释。将 50 μ l 甘油检测试剂加到 50 μ l 的各浓度标准品中，并设置三个复孔，1 小时后读取发光值。用每个标准品的浓度相对于其对应的相对发光单位 (RLU) 的平均值作图，并进行线性拟合。Glycerol-Glo™ Assay 可检测小于 1 μ M 的甘油，其上限为 80 μ M。有关发光转换为浓度的其他方法，请参见 4.A。

表 1. 甘油滴定数据

甘油 (pM)	80	60	40	20	10	5	2	1	0
相对光单位 RLU (千)	25,763	20,963	14,770	7,595	4,095	2,123	974	557	153
标准偏差 (千)	380	23	7	56	103	31	1	4	3
CV	1.5%	0.1%	0.0%	0.7%	2.5%	1.4%	0.1%	0.8%	1.8%
S/B	167.9	136.6	96.2	49.5	26.7	13.8	6.3	3.6	1.0
S/N	9,512.1	7,729.2	5,429.0	2,764.0	1,463.9	731.6	304.7	149.8	-

注意：变异系数 (CV) 为 $100 \times \text{STDEV} / \text{RLU}$ (标准偏差 / 相对光单位)。信背比 (S / B) 是样本的平均信号除以来自阴性对照的平均信号所取得的值。信噪比 (S / N) 是净信号 (平均信号减去平均阴性对照) 除以阴性对照的标准偏差所取得的值。

4. 实验示例

4.A. 脂肪细胞的脂解作用

使用 Glycerol-Glo™ Assay 可以很容易地对细胞释放的甘油进行测量。脂肪细胞中的脂解作用是甘油释放的一个示例 (图 4 和 5)。在没有刺激的情况下, 脂肪细胞可在 1 小时内释放约 15 μ M 的甘油。在存在脂解诱导剂异丙肾上腺素的情况下, 甘油在 1 小时内的释放量增加到约 112 μ M, 表明了脂解作用增加约 7.5 倍。甘油的释放量随细胞数量、孵育时间、脂解诱导剂的种类和浓度以及脂肪细胞的代谢状态而变化。还要注意的, 在本例中, 甘油的释放量超过了线性度 80 μ M 的上限, 因此在添加检测试剂之前需要进行稀释。

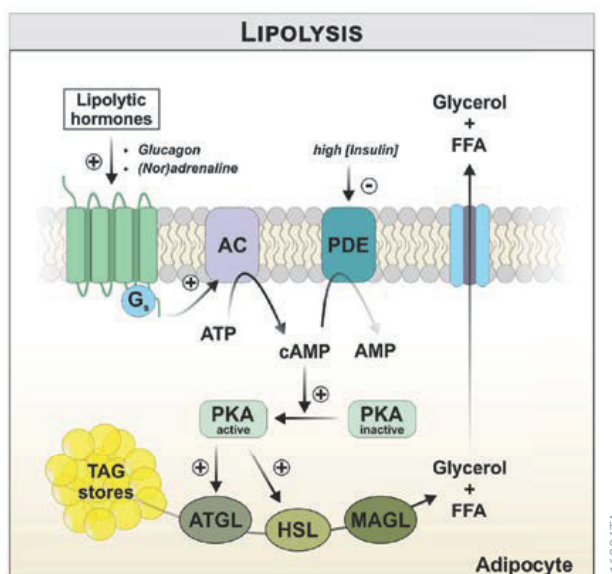


图 4. 脂肪细胞的脂解作用。脂解激素通过腺苷酸环化酶 (AC) 和蛋白激酶 A (PKA) 的酶促级联反应, 激活脂肪甘油三酯脂酶 (ATGL)、激素敏感性脂肪酶 (HSL) 和单酰基甘油脂肪酶 (MAGL)。这些酶将甘油三酯 (TAG) 贮存转化为甘油和游离脂肪酸 (FFA)。

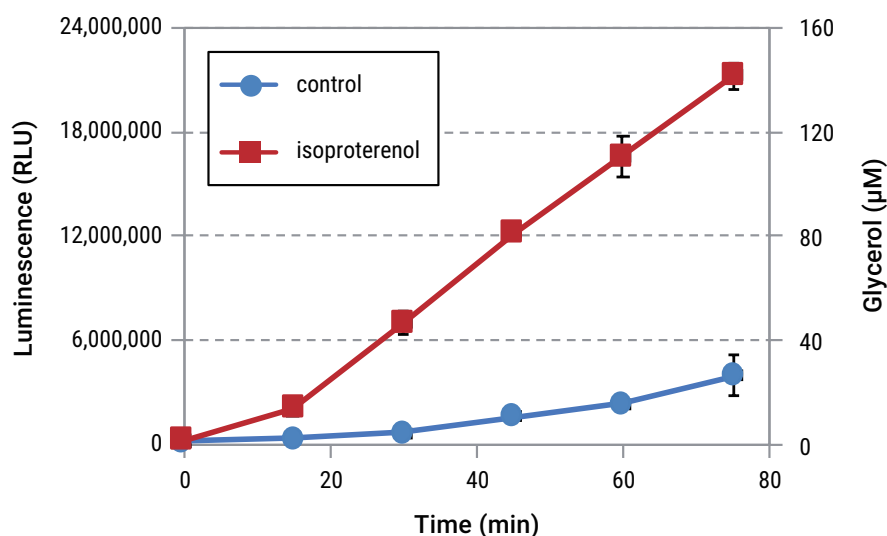


图 5. 脂肪细胞释放的甘油。脂肪细胞从 3T3L1-MBX 成纤维细胞分化而来（请参见 Uptake-Glo™ Assay Technical Manual #TM467 第 5.B 节中关于成纤维细胞分化为脂肪细胞的建议）。除去培养基，细胞使用 PBS 清洗两次。加入含有 2% 不含脂肪酸的 BSA 和 5μM triacsin C 的 RPMI（培养基）；BSA 与脂肪酸结合，而 triacsin C 抑制脂肪生成，两者均有助于促进细胞外甘油的积累。培养基还含有 0 或 10μM 异丙肾上腺素，作为对照或刺激条件。在不同时间点取出部分培养基样品，用 Glycerol Lysis Solution 以 1: 1 的比例进行稀释并检测甘油含量。

图 5 中的甘油浓度使用单一标准品方法计算，而不是用完整的标准曲线（图 6）。使用已知浓度（STD）的甘油标准品（RLU_{标准品}）的发光信号和不含甘油的阴性对照的发光信号（RLU_{背景}）以及下述公式，将每个脂解样品的发光信号（RLU_{样品}）转换为甘油浓度：

$$\text{样本的甘油浓度} = \text{STD} \times (\text{RLU}_{\text{样品}} - \text{RLU}_{\text{背景}}) / (\text{RLU}_{\text{标准品}} - \text{RLU}_{\text{背景}})$$

对于图 5 中在 1 小时处的数据，使用该公式计算出的未刺激和刺激条件下甘油的浓度分别为 7.5μM 和 56μM。由于样品被稀释了两倍，因此未刺激和刺激条件下培养基样品中的甘油浓度分别为 15μM 和 112μM。

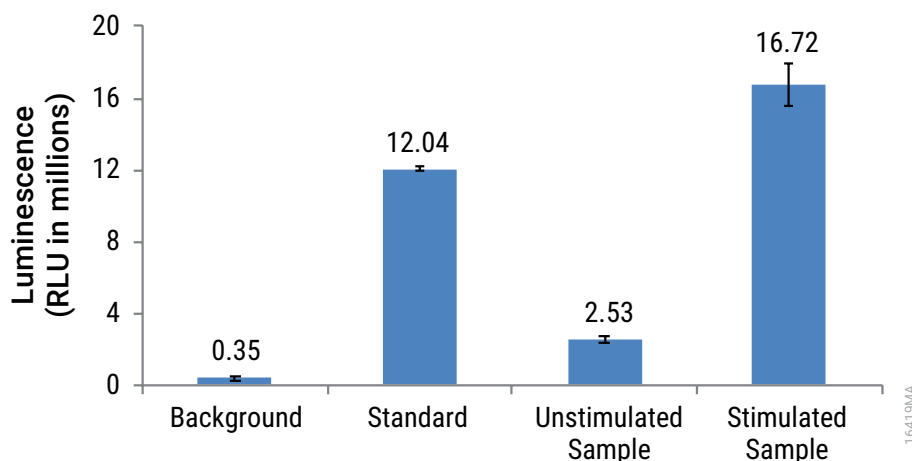


图 6. 使用单一甘油标准品计算甘油浓度。样本数据来自图 5 的 1 小时时间点。实验细节请参见图 5。该实验的标准品浓度为 40 μ M。RLU 值（以百万为单位）列于每栏的顶部。

4.B. 其他酶活性测量

Glycerol-Glo™ Assay 旨在测量体内细胞进程中所产生的甘油。另外，它还可用于在体外实验中检测酶的活性。例如，磷脂酶 D 将磷脂酰甘油水解为甘油和磷脂酸（3）。在图 7 中，来自链霉菌（Sigma Cat.# P4912）的磷脂酶 D 被滴定，可观察到发光和酶浓度之间的线性相关性。这个方法适用于测量产生甘油产物的任何酶的活性，但有几点需要说明，如果待研究的酶是储存在甘油溶液中的，则由于可能存在的高背景而无法测量甘油的变化。此外，如果酶具有明显的颜色，会吸收发出的光；使用不同量的此类酶时，可能需要考虑这种由颜色造成的淬灭。

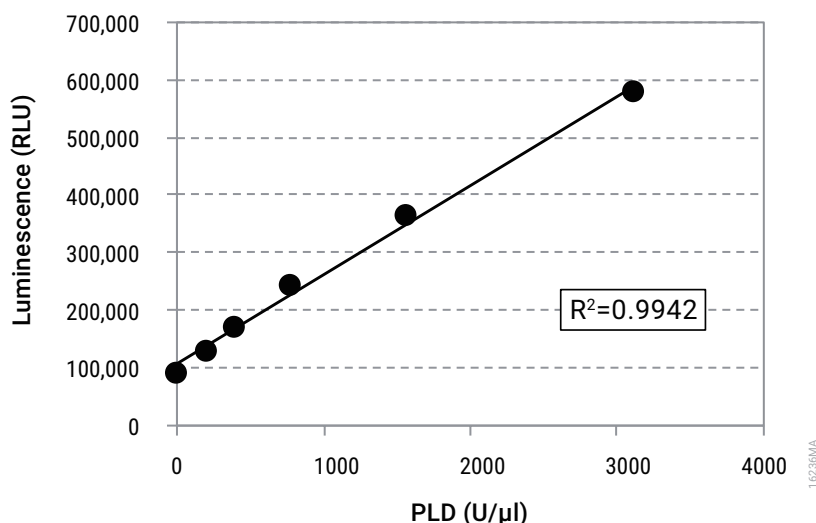


图 7. 磷脂酶 D 活性测量。一定浓度范围的磷脂酶 D（PLD）在 PBS 中与 40 μ M 的磷脂酰甘油以 1:1 混合，并在室温下孵育 1 小时。然后将该溶液与甘油检测试剂以 1:1 混合，并在 1 小时后记录发光。

5. 附录

5.A. 信号稳定性

在样品中加入甘油检测试剂后，Glycerol-Glo™ Assay 产生的信号可在数小时内保持稳定（图 8）。

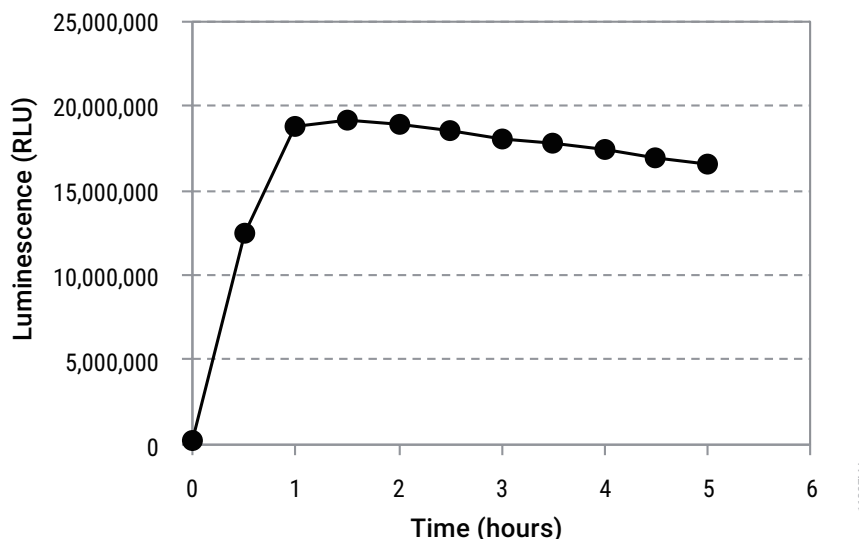


图 8. Glycerol-Glo™ Assay 的信号稳定性。将等体积的甘油检测试剂加入到稀释于 Glycerol Lysis Solution 的 40μM 甘油中，并在不同时间点记录发光信号。5 小时后，信号大于 1 小时信号的 50%，这有助于高通量的应用。

5.B. 温度和试剂兼容性

发光信号的强度和稳定性对温度敏感。为了获得一致的结果，使用前先将试剂和样品平衡至室温（22-25℃）。避免在待测试的样品中使用 DTT（二硫苏糖醇）和其他还原剂。还原剂会与 Reductase Substrate 反应并增加背景。

5.C. 微孔板和检测仪器

绝大多数标准的发光检测功能的微孔板读数仪均适用于此检测。有些仪器不需要调整增益，而另一些仪器可能需要优化增益设置以改善灵敏度和动态范围。每孔整合时间设置为 0.5-1 秒。有关精确的仪器设置，请查阅仪器手册。为获得最佳性能，请使用与发光检测仪兼容的不透光白色多孔板（例如，96 孔板 Corning Costar® #3917 或 384 孔板 Costar® #3570）。黑色孔板的发光信号会减弱，而透明板会增加孔与孔之间光信号的串扰。本技术手册数据中显示的 RLU 值取决于用于生成数据的孔板和发光检测仪。尽管相对发光的输出随不同仪器而变化，但这种变化不会影响测定性能。

5.D. 多重检测和归一化

Glycerol-Glo™ Assay 可以与细胞活力检测叠加用于归一化，并消除各孔之间的差异。如果取出部分培养基作为样品进行检测，则可以按照各自检测法所提供的操作步骤，对样品的其余部分使用 RealTime-Glo™，CellTiter-Fluor™ 或 CellTiter-Glo® Cell Viability Assays 来测定。如果与细胞内甘油的检测进行叠加，可以将 RealTime-Glo™ 和 / 或 CellTiter-Fluor™ 试剂添加到培养基中，并在取出培养基之前进行测量。为了确定处理操作是否对细胞有毒性，可将 LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay 与 Glycerol-Glo™ Assay 叠加检测。少量（2-5μl）培养基样品可移至单独的孔板上使用 LDH-Glo™ Assay 测定，剩余的细胞和培养基可以用于甘油的检测。

6. 参考文献

1. Vidugiriene, J. et al.(2014) Bioluminescent cell-based NAD(P)/NAD(P)H assays for rapid dinucleotide measurement and inhibitor screening.*Assay Drug Dev. Technol.* **12**, 514–526.
2. Leippe, D. et al.(2017) Bioluminescent assays for glucose and glutamine metabolism: High-throughput screening for changes in extracellular and intracellular metabolites.*SLAS Discovery*.**22**, 366–377.
3. Morita, S.Y. and Terada, T. (2015) Enzymatic measurement of phosphatidylglycerol and cardiolipin in cultured cells and mitochondria.*Sci.Rep.***5**, 11737.
4. *Glucose Uptake-Glo™ Assay Technical Manual #TM467.*

7. 相关产品

能量代谢检测

产品	规格	目录号
Triglyceride-Glo™ Assay	5 ml	J3160
Cholesterol/Cholesterol Ester-Glo™ Assay	5 ml	J3190
Glucose-Glo™ Assay	5ml	J6021
Glucose Uptake-Glo™ Assay	5ml	J1341
Glutamate-Glo™ Assay	5ml	J7021
Glutamine/Glutamate-Glo™ Assay	5ml	J8021
Lactate-Glo™ Assay	5ml	J5021
NAD(P)H-Glo™ Detection System	10ml	G9061
NAD/NADH-Glo™ Assay	10ml	G9071
NADP/NADPH-Glo™ Assay	10ml	G9081
Mitochondrial ToxGlo™ Assay	10ml	G8000
有其他规格可供选择		

细胞活力检测

产品	规格	目录号
RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay	100 次	G9711
CellTiter-Glo® 2.0 Assay	10ml	G9241
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	10ml	G7570
CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay	10ml	G9681
CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay	10ml	G6080
有其他规格可供选择		

细胞毒性检测

产品	规格	目录号
LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay	10ml	J2380
CellTox™ Green Cytotoxicity Assay	10ml	G8741
CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay	10ml	G9290
CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assay	10ml	G9260
有其他规格可供选择		

细胞活力和毒性多重检测

产品	规格	目录号
MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay	10ml	G9270
MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay	10ml	G9200
有其他规格可供选择		

氧化应激检测

产品	规格	目录号
ROS-Glo™ H ₂ O ₂ Assay	10ml	G8820
GSH-Glo™ Glutathione Assay	10ml	V6911
GSH/GSSG-Glo™ Assay	10ml	V6611
有其他规格可供选择		

检测仪器

产品	规格	目录号
GloMax® Discover System	一台	GM3000
GloMax® Explorer System	一台	GM3500

(a)U.S. Pat.Nos. 9,273,343 and 9,951,372, European Pat.No. 2751089, Japanese Pat.No. 6067019 and other patents pending.

© 2020 Promega Corporation.All Rights Reserved.

CellTiter Glo and GloMax are registered trademarks of Promega Corporation.CellTiterFluor, Glucose Uptake-Glo, Glycerol-Glo, LDH-Glo and RealTime-Glo are trademarks of Promega Corporation.

Costar is a registered trademark of Corning, Inc.

Products may be covered by pending or issued patents or may have certain limitations.Please visit our Web site for more information.All prices and specifications are subject to change without prior notice.

Product claims are subject to change.Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.