

糖原含量测定说明书

(货号: G0561W 微板法 96 样)

一、产品简介:

糖原是由葡萄糖分子通过糖苷键聚合而成的高分子物质,作为重要的能源物质储存于肝脏、肌肉和脑等重要器官。糖原的储存或代谢异常可引起多种疾病,因此测定糖原含量的变化,对研究糖原代谢及相关疾病有着重要的意义。

采用蒽酮法:即利用强碱性提取液提取糖原,浓硫酸是糖原脱水生产糖醛衍生物,糖醛类与蒽酮作用,在 620nm 处有最大吸收峰,再与相同方法处理的葡萄糖标准液比色定量。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×2 瓶	4℃保存	用前每瓶甩几下使粉剂落入底部,再加 10mL 浓硫酸,充分溶解混匀后使用;用不完的试剂 4℃保存 4-5 天。
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃保存	从标准管中称量取出 2mg 至一新 EP 管中,再加 2mL 蒸馏水溶解即 1mg/mL 的葡萄糖标准品溶液,再稀释 50 倍即 0.02mg/mL 标准品备用。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、水浴锅、可调式移液器、96 孔板、浓硫酸(不允许快递)和蒸馏水。

四、糖原含量检测:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

1、检测液制备:

A: 按照肝脏/肌肉样本质量(g):提取液体积(mL)为 1:3 的比例加入提取液(如取 0.1g 组织,加 0.3mL 提取液),进行匀浆得到匀浆液。再盖紧管盖(用封口膜封口)95℃水解 20min,室温冷却后即为糖原水解液。

①肝糖原检测液:在冷却后的糖原水解液 EP 管中加入 0.7mL 蒸馏水混匀总体积约 1mL, 8000rpm 室温离心 5min,取上清液 100μL 至新 EP 管中,再加 900μL 蒸馏水即上清液稀释 10 倍后作为检测液测定。

②肌糖原检测液:在冷却后的糖原水解液 EP 管中加入 0.7mL 蒸馏水混匀总体积约 1mL, 8000rpm 室温离心 5min,取上清液 200μL 至新 EP 管中,再加 200μL 蒸馏水即上清液稀释 2 倍后作为检测液测定。

③糖原含量低的组织样本:在冷却后的糖原水解液 EP 管中加入 0.7mL 蒸馏水混匀总体积约 1mL, 8000rpm 室温离心 5min,取上清液作为检测液测定。

B: 细胞样本:

先收集细胞到离心管内,离心后弃上清;取约 500 万细胞加 0.25mL 提取液,盖紧管盖(用封口膜封口)95℃水解 20min,室温冷却后再加 0.25mL 蒸馏水混匀,若浑浊则 8000rpm 室温离心 5min,取上清液作为检测液测定。

【注】:若增加样本量,可按照细菌/细胞数量(10^4):提取液(mL)为 500~1000:1 的比例进行提取。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上,调节波长至 620nm,所有试剂解冻至室温(25℃)。

② 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	空白管 (只做一次)	标准管 (只做一次)	测定管
蒸馏水	100		90
标准液		100	
检测液			10
试剂一	200	200	200
混匀，置 95℃水浴 5min（盖紧，防止水分散失），冷却， 取 200μL 转移至 96 孔板中，于 620nm 读取吸光值 A。			

【注】若 A 测定管值小于 0.01，可以增加测定管上样量 V 检测液（如增至 40μL），蒸馏水相应减少，则改变后的 V 检测液代入计算公式计算。

五、结果计算：

1、按样本重量计算：

$$\text{糖原(mg/g)} = (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \div (V_{\text{检测液}} \div V \times W) \div 1.11 \times D$$

$$= 0.0018 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V_{\text{检测液}} \div V \times W) \times D$$

2、按细胞数量计算：

$$\text{糖原}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times 10^3 \div (V_{\text{检测液}} \div V1 \times 500)$$

$$\div 1.11 \times D$$

$$= 1.8 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V_{\text{检测液}} \div V1 \times 500) \times D$$

V_标---0.1mL；

V_{检测液}---0.01mL；

V---提取液总体积，1mL；

V1---细胞提取液，0.5mL；

C_{标准}---标准品浓度，0.02mg/mL；

W---取样量，g；

500---细胞数量，万；

D---样本测试前稀释倍数，肝糖原 D 值为 10，肌糖原 D 值为 2；

1.11---是此法测得葡萄糖含量换算为糖原含量的常数。