

糖原含量试剂盒说明书

微量法 100管/96样

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

糖原是由葡萄糖单位构成的高分子多糖，是糖的主要的储存形式之一，主要贮存在肝和肌肉中作为备用能量，分别称为肝糖原和肌糖原。肝糖原可调节血糖浓度，当血糖升高时可在肝脏合成糖原，血糖降低时，肝糖原则分解为葡萄糖以补充血糖。因此，肝糖原对维持血糖的相对平衡十分重要。肌糖原是肌肉中糖的储存形式，在剧烈运动消耗大量血糖时，肌糖原不能直接分解成血糖，必须先分解产生乳酸，随血液循环到肝脏，通过糖异生转变为肝糖原或葡萄糖。

测定原理：

蒽酮法。利用强碱性提取液提取糖原，在强酸性条件下利用蒽酮显色剂测定糖原含量。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、浓硫酸（不允许快递）和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

提取液：液体100mL×1瓶，4℃保存；

试剂一：0.1mg/mL的葡萄糖标准液 10mL×1瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×1瓶，4℃保存；

糖原提取：

- 1、细胞或细菌：收集500~1000万细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；加入0.75mL提取液超声波破碎细菌或细胞（功率20%或200W，超声3s，间隔10s，重复30次）；转移至10mL试管中，95℃水浴20min（盖紧，防止水分散失），隔5min振摇试管1次，使充分混匀；取出试管冷却后，用蒸馏水定容到5ml，混匀，8000g 25℃离心10min，取上清液待测。
- 2、组织：称取0.1~0.2g样品，加入0.75mL提取液充分匀浆；转移至10ml试管中；95℃水浴20min（盖紧，防止水分散失），隔5min振摇试管1次，使充分混匀；待组织全部溶解后，取出试管冷却后，用蒸馏水定容到5ml，混匀，8000g 25℃离心10min，取上清液待测。

测定步骤

- 1、分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至620nm，蒸馏水调零。
- 2、调节水浴锅至95℃。
- 3、试剂二工作液的配制：在试剂二中倒入6mL蒸馏水，缓慢倒入24mL浓硫酸，充分溶解混匀后使用；用不完的试剂4℃保存一周；
- 4、加样表（在EP管中反应）：

试剂（ μL ）	空白管	标准管	测定管
待测样本			60
试剂一		60	
蒸馏水	60		

试剂二	240	240	240
-----	-----	-----	-----

混匀，置95°C水浴10min（盖紧，防止水分散失），冷却，取200 μ L转移至微量石英比色皿或96孔板中，于620nm波长处，分别读取空白管、标准管和测定管吸光度，分别记为A1、A2和A3。

注意：1、空白管和标准管只要测一次。

如果A3-A1大于2，需要将样本用蒸馏水稀释，计算公式中乘以相应稀释倍数。

糖原含量的计算：

1、按照样本质量计算

$$\text{糖原 (mg/mL)} = 1.11 \times (\text{C标准} \times V1) \times (A3 - A1) \div (A2 - A1) \div (W \times V1 \div V2) = 0.555 \times (A3 - A1) \div (A2 - A1) \div 0.05$$

2、按照蛋白质含量计算

$$\text{糖原(mg/mg prot)} = 1.11 \times (\text{C标准} \times V1) \times (A3 - A1) \div (A2 - A1) \div (V1 \times Cpr) = 0.111 \times (A3 - A1) \div (A2 - A1) \div Cpr$$

1.11：是此法测得葡萄糖含量换算为糖原含量的常数，即111 μ g糖原用蒽酮试剂显色相当于100 μ g葡萄糖用蒽酮所试剂显示的颜色；C标准管：标准管浓度，0.1mg/mL；V1：加入反应体系中待测样本体积，0.06mL；V2：加入提取液体积，5mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本鲜重，g。

注意：最低检测限为10ng/g鲜重或0.1ng/ mg prot。