

糖原含量测定说明书

(货号: ADS-W-TDX004-96 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°C 保存	
试剂一	粉剂 2 瓶	4°C 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°C 保存 4-5 天。
标准品	粉剂 1 支	4°C 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), 盖紧管盖 (用封口膜封口) 95°C 水解 20min, 室温冷却后即即为糖原水解液。

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 100 μ L 至新 EP 管中, 再加 900 μ L 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 200 μ L 至新 EP 管中, 再加 200 μ L 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°C 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°C)。

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°C 水浴 5min (盖紧，防止水分散失)，冷却，取 $200\mu\text{L}$ 转移至 96 孔板中，于 620nm 读取吸光值 A。

【注】若 A 测定管值在零附近，可以增加测定管上样量 V 检测液 (如增至 $40\mu\text{L}$)，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：

$$\begin{aligned} \text{糖原}(\text{mg/g}) &= (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times (\text{C}_{\text{标准}} \times \text{V}_{\text{标}}) \div (\text{V}_{\text{检测液}} \div \text{V} \times \text{W}) \div 1.11 \times \text{D} \\ &= 0.0018 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div (\text{V}_{\text{检测液}} \div \text{V} \times \text{W}) \times \text{D} \end{aligned}$$

2、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{糖原}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times (\text{C}_{\text{标准}} \times \text{V}_{\text{标}}) \times 10^3 \div (\text{V}_{\text{检测液}} \div \text{V}1 \times 500) \\ &\quad \div 1.11 \times \text{D} \\ &= 1.8 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div (\text{V}_{\text{检测液}} \div \text{V}1 \times 500) \times \text{D} \end{aligned}$$

$\text{V}_{\text{标}}$ --- 0.1mL ;

$\text{V}_{\text{检测液}}$ --- 0.01mL ;

V---提取液总体积， 1mL ;

V1---细胞提取液， 0.5mL ;

$\text{C}_{\text{标准}}$ ---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。