

## 糖原含量（酶法）测定说明书

（货号：ADS-W-TDX004 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。

本试剂盒采用酶法测定糖原含量，淀粉葡萄糖苷酶分解糖原成葡萄糖，葡萄糖被葡萄糖氧化酶氧化以产生与显色剂反应的（粉）红色产物，该产物在 510nm 处有最大吸收峰，通过校正游离的葡萄糖背景值进而得到糖原含量。

### 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 120mL×1 瓶 | 4°C保存   |   |
| 试剂一  | 液体 2.5mL×1 支 | 4°C保存   |   |
| 试剂二  | 粉体 1 支       | -20°C保存 | 临用前甩几下使液体落入底部，再加 2.2mL 的蒸馏水溶解备用                                     |
| 试剂三  | 液体 40mL×1 瓶  | 4°C保存   |   |
| 标准管  | 粉体 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5倍即0.2mg/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、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、样本匀浆液制备：

##### ① 组织样本：

按照肝脏/肌肉样本质量（g）：提取液体积(mL)为 1：10 的比例加入提取液（如取 0.1g 组织，加 1mL 提取液），进行匀浆得到样本匀浆液。

##### ② 细胞样本：

先收集细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；得到样本匀浆液。

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

##### ③ 液体样本：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

#### 2、上机检测：

① 酶标仪调节波长至 510nm，所有试剂解冻至室温（25°C）。

② 若是高糖原含量的肝脏样本，可用蒸馏水对样本匀浆液进行 2-5 倍稀释再按下表加样测定，在 EP 管中依次加入：

| 试剂名称 (μL)                   | 测定管 | 对照管 |
|-----------------------------|-----|-----|
| 样本匀浆液                       | 20  | 20  |
| 蒸馏水                         | 55  | 80  |
| 95°C沸水浴 3min，冷却至室温继续加入      |     |     |
| 试剂一                         | 25  |     |
| 混匀，37°C条件下孵育 1.5h(使糖原充分被水解为 |     |     |

葡萄糖), 12000rpm 离心 5min, 取上清液待测。

③ 在 96 孔板中依次加入:

| 试剂名称 (μL)  | 测定管 | 对照管 | 标准管<br>(仅做一次) | 空白管<br>(仅做一次) |
|--|-----|-----|---------------|---------------|
| ②步得到的上清液   | 10  | 10  |               |               |
| 标准品  |     |     | 10            |               |
| 蒸馏水  |     |     |               | 10            |
| 试剂二  | 10  | 10  | 10            | 10            |
| 试剂三  | 180 | 180 | 180           | 180           |
| 混匀, 室温 (25°C) 条件下避光孵育 20min, 510nm 下读取吸光值 A,<br>ΔA 糖原=A 测定-A 对照 (每个样本做一个自身对照)。 |     |     |               |               |

【注】1.若 A 测定值大于 0.8, 可用蒸馏水对②步得到的上清液进行稀释再测定, 则稀释倍数 D 代入公式计算;

2.若 ΔA 糖原的值在零附近, 可增加③中上清液的上样体积 V<sub>2</sub> (如增至 40μL, 则试剂三相应减少), 则改变后的 V<sub>2</sub> 代入计算公式重新计算。

## 五、结果计算:

1、按样本鲜重计算:

$$\begin{aligned} \text{糖原含量(mg/g)} &= \Delta A \text{ 糖原} \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times (V_1 \div V_2) \div (V_{\text{匀浆液}} \div V \times W) \\ &\div 1.11 \times D \\ &= 0.9 \times \Delta A \text{ 糖原} \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W \times D \end{aligned}$$

2、按细胞数量计算:

$$\begin{aligned} \text{糖原含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= \Delta A \text{ 糖原} \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times (V_1 \div V_2) \div (V_{\text{匀浆液}} \div V \times 500) \\ &\div 1.11 \times D \\ &= 1.8 \times \Delta A \text{ 糖原} \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times D \end{aligned}$$

3、按液体样本计算:

$$\begin{aligned} \text{糖原含量(mg/g)} &= \Delta A \text{ 糖原} \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times (V_1 \div V_2) \div V_{\text{匀浆液}} \div 1.11 \times D \\ &= 0.9 \times \Delta A \text{ 糖原} \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times D \end{aligned}$$

V<sub>标</sub>---0.01mL;

V<sub>1</sub>---②步中反应总体积, 0.1mL;

V---提取液总体积, 1mL;

W---取样量, g;

1.11---是此法测得葡萄糖含量换算为糖原含量的常数。

V<sub>匀浆液</sub>---0.02mL;

V<sub>2</sub>---③步中上清液体积, 0.01mL;

C<sub>标准</sub>---标准品浓度, 0.2mg/mL;

D---样本测试前稀释倍数, 未稀释即为 1;

500---细胞数量, 万。