

糖原含量测定说明书

(货号: BP10296F 分光法 48 样 有效期: 6 个月)

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 15mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 2 瓶	4°C保避光存	每瓶: 1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 15mL 浓硫酸, 充分溶解混匀后使用; 3. 用不完的试剂 4°C保存 4-5 天。
标准品	粉剂 1 支	4°C保存	1. 从标准管中称量取出 2mg 至一新 EP 管中; 2. 加入 2mL 蒸馏水溶解即 1mg/mL 的葡萄糖标准品溶液; 3. 再稀释 50 倍即 0.02mg/mL 标准品备用; 4. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、所需的仪器和用品:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、**浓硫酸** (不允许快递)、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

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（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、上机检测：

- ① 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 620nm，蒸馏水调零。
- 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	300		270
标准液		300	
检测液			30
试剂一	600	600	600
混匀，置 95℃水浴 5min（盖紧用封口膜封口，防止水分散失），冷却后转移至 1mL 比色皿中，于 620nm 处读取吸光值 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 60μL），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：

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

$$= 0.0054 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D \div (V_{\text{检测液}} \div V \times W)$$

2、按细胞数量计算：

$$\text{糖原}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times 10^3 \div (V_{\text{检测液}} \div V1 \times 500) \div 1.11 \times D$$

$$= 5.45 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V_{\text{检测液}} \div V1 \times 500) \times D$$

3、按蛋白浓度计算：

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

$$= 0.0054 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D \div (V_{\text{检测液}} \div V \times Cpr)$$

V_标---0.3mL；

V_{检测液}---0.03mL；

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；

Cpr---蛋白浓度（mg/mL）；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。