

糖原含量测定说明书

(货号: BP10296W 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 2 瓶	4℃避光保存	每瓶: 1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 10mL 浓硫酸, 充分溶解混匀后使用; 3. 用不完的试剂 4℃保存 4-5 天。
标准品	粉剂 1 支	4℃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、实验器材:

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)、96 孔板、离心管、酶标仪、**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:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

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℃水解 20min, 室温冷却后即糖原水解液。

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°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、检测步骤:

- 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:

试剂组分 (μ L)	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 μ 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 μ 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:

$$\text{糖原(mg/g)} = (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \div (V_{\text{检测液}} \div V \times W) \div 1.11 \times D \\ = 0.0018 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V_{\text{检测液}} \div V \times W) \times D$$

2、按细胞数量计算:

$$\text{糖原}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times 10^3 \div (V_{\text{检测液}} \div V_1 \times 500) \\ \div 1.11 \times D \\ = 1.8 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V_{\text{检测液}} \div V_1 \times 500) \times D$$

3、按蛋白浓度计算:

$$\text{糖原(mg/mg prot)} = (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \div (V_{\text{检测液}} \div V \times C_{\text{pr}}) \div 1.11 \times D \\ = 0.0018 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V_{\text{检测液}} \div V \times C_{\text{pr}}) \times D$$

$V_{\text{标}}$ ---0.1mL;

$V_{\text{检测液}}$ ---0.01mL;

V---提取液总体积, 1mL;

V_1 ---细胞提取液, 0.5mL;

$C_{\text{标准}}$ ---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;

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