

糖原含量试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

注 意：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℃水浴 10min（盖紧，防止水分散失），冷却，取 200μL 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。

2、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

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

2、按照蛋白质含量计算

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

1.11：是此法测得葡萄糖含量换算为糖原含量的常数，即 111μg 糖原用蒽酮试剂显色相当于 100μg 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。