糖原含量测定说明书

（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℃保存	
试剂一	粉剂 mg×2 瓶	4℃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℃保存 4-5 天。
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃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），进行匀浆得到匀浆液。再盖紧管盖（用封口膜封口）95℃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（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℃）。

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℃水浴 5min（盖紧，防止水分散失），冷却，取 200μL 转移至 96 孔板中，于 620nm 读取吸光值 A。			

【注】若 A 测定管值小于 0.01，可以增加测定管上样量 V 检测液（如增至 40μL），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：

糖原(mg/g)=(A 测定-A 空白)÷(A 标准-A 空白)×($C_{标准}$×$V_{标}$)÷($V_{检测液}$÷V×W)÷1.11×D

=0.0018×(A 测定-A 空白)÷(A 标准-A 空白)÷($V_{检测液}$÷V×W)×D

2、按细胞数量计算：

糖原(μg/10^4 cell)=(A 测定-A 空白)÷(A 标准-A 空白)×($C_{标准}$×$V_{标}$)×10^3÷($V_{检测液}$÷V1×500)÷1.11×D

=1.8×(A 测定-A 空白)÷(A 标准-A 空白)÷($V_{检测液}$÷V1×500)×D

$V_{标}$---0.1mL；　　$V_{检测液}$---0.01mL；

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。