糖原含量（酶法）测定说明书

（微板法 48 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 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 1.3mL×1 支	4℃保存	
试剂二	液体 1.2mL×1 支	-20℃保存	
试剂三	三 A：液体 16mL×1 瓶 三 B：液体 8mL×1 瓶	4℃保存	临用前按照试剂三 A:三 B=2:1 的比例混合制备成**试剂三 mix**（建议该混合液用多少配多少，且避光保存，且一周内用完）。
标准管	粉体 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，了解本批样品和实验流程，避免样本和试剂浪费！

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（10^4）：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℃）。

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℃沸水浴 3min，冷却至室温继续加入		
试剂一	25	
混匀，37℃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 （仅做一次）	空白管 （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℃）条件下避光孵育 20min，510nm 下读取吸光值 A，△A 糖原=A 测定-A 对照（每个样本做一个自身对照）。				

五、结果计算：

1、按样本鲜重计算：

糖原含量(mg/g)=△A 糖原÷(A 标准-A 空白)×($C_{标准}$×$V_{标}$) ×(V1÷V_2)÷($V_{匀浆液}$÷V×W)

÷1.11×D

=0.9×△A 糖原÷(A 标准-A 空白)÷W×D

2、按细胞数量计算：

糖原含量(μg/10^4 cell)=△A 糖原÷(A 标准-A 空白)×($C_{标准}$×$V_{标}$) ×(V1÷V_2)÷($V_{匀浆液}$÷V×500)

÷1.11×D

=1.8×△A 糖原÷(A 标准-A 空白)×D

3、按液体样本计算：

糖原含量(mg/mL)=△A 糖原÷(A 标准-A 空白)×($C_{标准}$×$V_{标}$) ×(V1÷V_2)÷$V_{匀浆液}$÷1.11×D

=0.9×△A 糖原÷(A 标准-A 空白)×D

4、按蛋白浓度计算：

糖原含量(mg/mg prot)=△A 糖原÷(A 标准-A 空白)×($C_{标准}$×$V_{标}$) ×(V1÷V_2)÷($V_{匀浆液}$÷V×Cpr)

÷1.11×D

=0.9×△A 糖原÷(A 标准-A 空白)÷Cpr×D

$V_{标}$---0.01mL；　　$V_{匀浆液}$---0.02mL；

V1---②步中反应总体积，0.1mL；　　V_2---③步中上清液体积，0.01mL；

V---提取液总体积，1mL；　　$C_{标准}$---标准品浓度，0.2mg/mL；

W---取样量，g；　　D---样本测试前稀释倍数，未稀释即为 1；

500---细胞数量，万；　　1.11---是此法测得葡萄糖含量换算为糖原含量的常数；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。