

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	粉体 mg×1 支	-20℃ 保存	临用前甩几下使液体落入底部，再加 1.1mL 的蒸馏水溶解备用
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4℃ 保存	
标准管	液体 mL×1 支	4℃ 保存	母液为 1mg/mL 葡萄糖，临用前用蒸馏水稀释 5 倍即 0.2mg/mL 葡萄糖待用。

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，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

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。

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（ μ L）	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, ΔA 糖原=A 测定-A 对照 (每个样本做一个自身对照)。				

【注】1.若 A 测定值大于 0.8, 可用蒸馏水对②步得到的上清液进行稀释再测定, 则稀释倍数 D 代入公式计算;

2.若 ΔA 糖原的值在零附近, 可增加③中上清液的上样体积 V₂ (如增至 40μL, 则试剂三相应减少), 则改变后的 V₂ 代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、按样本鲜重计算:

$$\begin{aligned} \text{糖原含量(mg/g)} &= \Delta A \text{ 糖原} \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times (V_1 \div V_2) \div (V_{\text{匀浆液}} \div V \times W) \\ &\div 1.11 \times D \\ &= 0.9 \times \Delta A \text{ 糖原} \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W \times D \end{aligned}$$

2、按细胞数量计算:

$$\begin{aligned} \text{糖原含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= \Delta A \text{ 糖原} \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times (V_1 \div V_2) \div (V_{\text{匀浆液}} \div V \times 500) \\ &\div 1.11 \times D \\ &= 1.8 \times \Delta A \text{ 糖原} \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times D \end{aligned}$$

V_标---0.01mL;

V_{匀浆液}---0.02mL;

V₁---②步中反应总体积, 0.1mL;

V₂---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;

1.11---是此法测得葡萄糖含量换算为糖原含量的常数。

500---细胞数量, 万。