

组织及血液糖原含量检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AYHB2-M96	组织及血液糖原含量试剂盒	96T	微量法

产品说明:

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。

试剂组成:

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 100 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂一	粉剂×1 支	2-8℃ 保存
试剂二	粉剂×2 瓶	2-8℃ 保存

溶液的配制:

1. 试剂一: 10 mg 葡萄糖。临用前加1mL蒸馏水充分溶解, 2-8℃ 保存两周。
2. 工作液的配制: 临用前取1瓶试剂二倒入3 mL蒸馏水, 缓慢倒入12 mL浓硫酸, 充分溶解混匀后使用。用不完的的试剂2-8℃ 保存一周。

操作步骤:

一、样本处理

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200W, 超声3s, 间隔10s, 重复30次); 转移至10mL试管中, 置于沸水浴中煮沸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样本, 置于10mL试管中, 用手术剪尽量剪碎; 加入0.75mL提取液, 置于沸水浴中煮沸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。

二、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, 分光光度计蒸馏水调零。
2. 试剂一稀释: 取10 μ L 10mg/mL葡萄糖标准液, 加入990 μ L蒸馏水, 充分混匀, 配制成0.1mg/mL葡萄糖溶液备用, 现用现配。(实验中每管需要60 μ L, 为减小实验误差, 故配制大体积。)
3. 加样表(在EP 管中反应):

试剂(μ L)	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，沸水浴10min（盖紧，防止水分散失），冷却，取200 μ L转移至微量比色皿或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。（空白管和标准管只要测1-2次）

三、糖原含量的计算

1、按照样本质量计算

$$\text{糖原 (mg/g 质量)} = (C_{\text{标准}} \times V_1) \times (A_3 - A_1) \div (A_2 - A_1) \div (W \times V_1 \div V_2) \div 1.11 = 0.450 \times (A_3 - A_1) \div (A_2 - A_1) \div W$$

2、按照样本蛋白浓度计算

$$\text{糖原 (mg/mg prot)} = (C_{\text{标准}} \times V_1) \times (A_3 - A_1) \div (A_2 - A_1) \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \div 1.11 = 0.09 \times (A_3 - A_1) \div (A_2 - A_1) \div C_{\text{pr}}$$

3、按照细菌或细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{糖原 (mg/10}^4 \text{ cell)} &= (C_{\text{标准}} \times V_1) \times (A_3 - A_1) \div (A_2 - A_1) \div (\text{细菌或细胞数量} \times V_1 \div V_2) \div 1.11 \\ &= 0.450 \times (A_3 - A_1) \div (A_2 - A_1) \div \text{细菌或细胞数量} \end{aligned}$$

1.11：是此法测得葡萄糖含量换算为糖原含量的常数，即111 μ g葡萄糖用蒽酮试剂显色相当于100 μ g糖原用蒽酮所试剂显示的颜色；C标准：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：样本总体积，5mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细菌或细胞数量：以10⁴为单位，万个。

注意事项：

如果吸光值大于1.4，建议将样本用蒸馏水稀释后进行测定。
