

## 肝肌糖原含量检测试剂盒说明书

规格：微量法 96样

检测波长：620nm

编号：JLC\_K14815

线性范围：0.05-0.1mg/mL

检出限：0.05mg/mL

检测原理：WST-8显色法

### 注意

正式测定前务必取 3 - 5 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°C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°C离心10min，取上清液待测。

2、**肝脏组织**：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°C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°C离心10min，取上清液待测。

3、**肌肉组织**：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°C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2ml，混匀，8000g 25°C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°C。
- 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°C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	-	-
试剂二工作液	240	240	240

混匀，置95°C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。如果A3-A1小于0.3，则需要提高样品浓度。

### 糖原含量的计算

#### 1、糖原含量的计算：

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

#### 2、按照肌肉样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{糖原 (mg/g鲜重)} &= 1.11 \times (\text{C标准} \times \text{V1}) \times (\text{A3-A1}) \div (\text{A2-A1}) \div (\text{W} \times \text{V1} \div \text{V3}) \\ &= 0.222 \times (\text{A3-A1}) \div (\text{A2-A1}) \div \text{W} \end{aligned}$$

#### 3、按照蛋白质含量计算：

$$\begin{aligned} \text{糖原 (mg/mg prot)} &= 1.11 \times (\text{C标准} \times \text{V1}) \times (\text{A3-A1}) \div (\text{A2-A1}) \div (\text{V4} \times \text{Cpr}) \\ &= 0.111 \times (\text{A3-A1}) \div (\text{A2-A1}) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

1.11：是此法测得葡萄糖含量换算为糖原含量的常数，即111ug糖原用蒽酮试剂显色相当于100ug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：按照肝脏组织提取中加入蒸馏水定容后的体积，5 mL；

V3：按照肌肉组织提取中加入蒸馏水定容后的体积，2 mL；

V4：按照细菌或细胞提取中加入蒸馏水定容后的体积，5 mL；

Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；

W：样本鲜重，g。

### 预实验的意义

#### **比色法检测试剂盒预实验非常重要**

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；
- 5、通过3 - 5组预实验，判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。