

肝/肌糖原含量

规格：微量法 96 样

检测波长：620nm

编号：ml300803

线性范围：0.05-0.1mg/mL

检出限：0.05mg/mL

检测原理：蒽酮法

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。

试剂的组成和配制：

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、按照肝脏样本质量计算

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

2、按照肌肉样本质量计算

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

3、按照蛋白质含量计算

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

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。