

糖原（Glycogen）测定试剂盒说明书

（货号：A043-1-1 蒽酮比色法 50 管/48 样）

免责声明：测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验,否则由此导致的后果用户自行承担!

一、测定原理：

糖原（Glycogen）在浓硫酸的作用下可脱水生成糖醛衍生物，后者再与蒽酮作用形成蓝色化合物，与同法处理的标准葡萄糖溶液比色即可定量。糖原在浓碱溶液中非常稳定，故在显色之前先将组织放入浓碱中加热以破坏其它成分而保留糖原。

二、试剂组成与配制：（试剂盒有效期 6 个月）

试剂一：碱液，40mL×1 瓶，室温或 2~8℃ 保存。

试剂二：1mg/mL 葡萄糖标准贮备液，1mL×1 支，室温或 2~8℃ 保存。临用前按 1mg/mL 葡萄糖标准品贮备液：蒸馏水=1：9 的比例混合配成 **0.1mg/mL 葡萄糖标准液**，用多少配多少,现用现配，当天有效。

试剂三：显色粉剂×6 支，室温或 2~8℃ 保存。用时每支加浓硫酸 25mL（浓硫酸自备）搅拌混匀溶解，现用现配。

显色剂配制的注意点：

- 1、浓硫酸浓度必须 95%-98%的分析纯并且不可开瓶太久（开瓶放置太久，浓度会降低）。
- 2、配制显色剂的容器和量筒必须绝对干燥，否则会使试剂三无法充分溶解。
- 3、配制显色剂：先将粉剂倒入烧杯中，然后加少量浓硫酸（约 10mL），用玻棒小心搅拌，使其充分溶解，然后再加入剩余量的浓硫酸，充分搅拌后室温避光保存(颜色应为黄色,变绿或黑后弃用)。

三、所需仪器及试剂：

可见分光光度计及 1cm 光径比色皿，沸水浴锅，电子秤，蒸馏水，生理盐水，浓硫酸（分析纯），涡旋混匀器，烧杯及玻璃棒。

四、样本前处理：

1、组织样本处理：

① **取样：**取组织样本（如肝脏或肌肉）用生理盐水漂洗后，滤纸吸干，剪碎后在试管或离心管中精确称重（50~100mg）。

② **水解：**按样本重量（mg）：碱液体积（μL）=1：3 的比例加入碱液，加盖后（管盖扎一小孔透气）置沸水浴煮 20min，流水冷却(即为水解液)。

例如：肝脏组织称重 75mg 按重量体积比 1：3 应加入碱液的量为 225μL；肌肉组织称重 85mg 按重量体积比 1：3 应加入碱液的量为 255μL。

③ 将糖原水解液进一步制备成糖原检测液：

肝糖原检测液为 1%，加蒸馏水的量为：肝脏重量×100 - 肝脏重量×4=肝脏重量×96

肌糖原检测液为 5%，加蒸馏水的量为：肌肉重量×20 - 肌肉重量×4=肌肉重量×16

注：4*为水解时碱液与组织的体积数。

例如上例：制备 1%肝糖原检测液，加蒸馏水的量为：75×96=7200μL=7.2 mL；制备 5%肌糖原检测液，加蒸馏水的量为：85×16=1360μL=1.36mL。

2、细胞样本前处理：

① 细胞沉淀的收集（细胞数量在 100 万个以上）：

(1)、对于悬浮培养的细胞，直接取细胞悬液，1000rpm 离心 10 min，弃上清留细胞沉淀。

(2)、对于贴壁培养的细胞，用胰酶将细胞消化下来，或用细胞刮将细胞刮下来（消化后或刮细胞时可加入 0.5mL 0.01M 的 PBS（或生理盐水）冲洗细胞），制成细胞悬液，再 1000rpm 离心 10min，弃上清留细胞沉淀。

② 细胞沉淀的洗涤：

在细胞沉淀中加入 0.5~1mL 的缓冲液（0.01mol/L pH7~7.4 磷酸盐缓冲液或生理盐水），轻轻混匀，1000rpm 离心 10 min，弃上清留细胞沉淀。

③ 水解：

(1) **破碎后水解（适用于未知细胞数量或者细胞数量差异较大的样本）：**细胞沉淀加入 0.2~0.5mL 缓冲液（0.01mol/L pH7~7.4 磷酸盐缓冲液或生理盐水），冰水浴条件下超声破碎或手动匀浆，不离心，直接取样（取出部分测总蛋白浓度，总蛋白浓度测定试剂盒本公司有售，推荐 A045-3/-4, BCA 法总蛋白测定试剂盒）0.05mL 加入碱溶液 0.15mL,沸水浴 20 min，流水冷却，即为**糖原检测液**。（注：细胞破碎后应尽快加碱液及沸水浴处理，否则可能造成糖原消耗损失）

(2) **不破碎直接水解（适用于细胞总数相近，已计数或不考虑细胞总数的样本）：**每管加入碱溶液 0.25mL,沸水浴 20 min，流水冷却，加蒸馏水 0.25mL，即为**糖原检测液**。

五、操作表：

	空白管	标准管	测定管
蒸馏水(mL)	1.0	0.9	0.9
0.1mg/mL 标准液(mL)		0.1	
糖原检测液(mL)			0.1
显色液(mL)	2	2	2
混匀后置沸水中反应 5min，取出冷却后混匀，于 620nm 波长，1cm 光径，空白管调零，测各管吸光值 A			

[注]：加完显色液必须充分混匀后再沸水浴，否则会出现絮状物；若是测定管吸光值较低（如≤0.02），可加大测定管糖原检测液的量（相应的蒸馏水的量需减少），计算时标准液浓度需相应调整（如测定管糖原检测液量加大至 0.5mL，则测定管蒸馏水量减少至 0.5mL，计算时标准液浓度则为 0.02 mg/mL，以此类推）。

六、计算公式：

1、组织样本计算公式：

$$\text{糖原含量 (mg/g 组织)} = \frac{A_{\text{测定}}}{A_{\text{标准}}} \times C_{\text{标准}} \div C_{\text{水解液}} \div 1.11$$

C_{标准}：标准液浓度，0.1mg/mL；

C_{水解液}：样本水解液浓度，即肝脏为 1%（0.01g/mL）、肌肉为 5%（0.05g/mL）；（需要注意的是,不同物种肝/肌糖原含量不同,如第一次做本实验,可在制备水解液时统一先制备成 5%浓度,然后再以预实验看浓度高低,如偏高则再稀释后测定，计算时乘上稀释倍数）。

1.11：本法葡萄糖含量换算成糖原含量的系数，即 100μg 糖原用蒽酮试剂显色的颜色相当于 111μg 葡萄糖用蒽酮试剂显色的颜色。

2、细胞样本计算公式：

① 破碎后水解的细胞计算：

$$\text{糖原含量 (mg/mg 蛋白)} = \frac{A_{\text{测定}}}{A_{\text{标准}}} \times C_{\text{标准}} \div 1.11 \div C_{\text{pr}}$$

② 不破碎直接水解的细胞计算：

$$\text{糖原总量 (mg)} = \frac{A_{\text{测定}}}{A_{\text{标准}}} \times C_{\text{标准}} \div 1.11 \times V_{\text{样总}}$$

C_{标准}：标准液浓度，0.1mg/mL；

C_{pr}：细胞匀浆蛋白浓度，mg/mL；

V_{样总}：制备得到的糖原检测液总体积，0.5mL。

1.11 为此法测得的葡萄糖含量换算成糖原含量的系数，即 100μg 糖原用蒽酮试剂显色的颜色相当于 111μg 葡萄糖用蒽

酮试剂显色的颜色。

七、检测范围：

0.01-1.0mg/mL（通过代入 $\frac{A_{\text{测定}}}{A_{\text{标准}}} \times C_{\text{标准}}$ 计算判定）。

附录 I：脂肪肝样本糖原测定

一、样本前处理：

- 1、**取样：**取新鲜肝脏样本用生理盐水漂洗后，滤纸吸干，剪碎后在试管或离心管中精确称重（50~100mg）。
- 2、**水解：**按样本重量（mg）：碱液体积（μL）=1：3 的比例加入碱液，加盖后（管盖扎一小孔透气）置沸水浴煮 20min，流水冷却(即为水解液)。
- 3、**将糖原水解液进一步制备成糖原检测液：**
肝糖原检测液为 5%，加蒸馏水的量为：肝脏重量×20 - 肝脏重量×4=肝脏重量×16(注：4 为水解时碱液与组织的体积数)。
- 4、**检测液除脂：**
取上述制备好的检测液（一般可见检测液上层漂浮有乳白色油状物），加入一定量的三氯甲烷，可按照检测液量(mL)：氯仿(mL)=4:1 的比例来加，随后漩涡混匀 1 分钟左右，再 3500 转/分，离心 10 分钟，取上清用于测定（如含量较高（测定管吸光值大于 0.4），需将上清用蒸馏水稀释后再测定）。
注：脂质含量稍高或无法分辨的样本也可用此法处理，所测值将更准确。

二、操作表：

	空白管	标准管	测定管
蒸馏水(mL)	1.0	0.9	0.9
0.1mg/mL 标准液(mL)		0.1	
糖原检测液(mL)			0.1
显色液(mL)	2	2	2
混匀后置沸水中反应 5min，取出冷却后混匀，于 620nm 波长，1cm 光径，空白管调零，测各管吸光值 A			

三、计算：

$$\text{糖原含量 (mg/g 组织)} = \frac{A_{\text{测定}}}{A_{\text{标准}}} \times C_{\text{标准}} \div C_{\text{水解液}} \div 1.11$$

- C_{标准}：标准液浓度，0.1mg/mL；
- C_{水解液}：样本水解液浓度，即肝脏为 5%（0.05g/mL）；
- 1.11：本法葡萄糖含量换算成糖原含量的系数，即 100μg 糖原用蒽酮试剂显色的颜色相当于 111μg 葡萄糖用蒽酮试剂显色的颜色。