

糖原 (Glycogen) 测定试剂盒

(货号: BC097 蒽酮比色法 50 管/48 样)

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: 碱溶液, 40mL×1 瓶, 室温或 2~8°C 保存。

试剂二: 1mg/mL 葡萄糖标准贮备液, 1mL×1 支, 室温或 2~8°C 保存。临用前将 1mg/mL 葡萄糖标准品贮备液: 双蒸水=1:9 的比例混合配成 **0.1mg/mL 葡萄糖标准应用液**, 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°C 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、配制显色剂时: 先将粉剂倒入烧杯中, 然后加少量浓硫酸 (约 10mL), 用玻璃棒小心搅拌, 使其充分溶解, 然后再加入剩余的浓硫酸, 充分搅拌后室温避光保存。

三、所需仪器及试剂:

可见光分光光度计及 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, 称重 (样本重量 ≤100mg 为宜, 不要 > 100mg)。
- ② **水解:** 按样本重量 (mg) : 碱液体积 (μL) = 1 : 3, 一起加入试管中, 沸水浴煮 20min, 流水冷却。

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%, 加双蒸水的量为: 肝脏重量×100 - 肝脏重量×4* = 肝脏重量×96

肌糖原检测液为 5%, 加双蒸水的量为: 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, 加双蒸水的量为: 75×96=7200μL = 7.2 mL; 制备 5% 肌糖原检测液, 加双蒸水的量为: 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/分钟 离心 10 分钟, 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, 制成细胞悬液, 1000rpm/分钟 离心 10 分钟, 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 (0.1mol/L pH7~7.4 磷酸盐缓冲液或生理盐水), 轻轻混匀, 1000rpm/分钟离心 10 分钟, 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 (0.1mol/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所有售, 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 分钟, 流水冷却, 即为**糖元检测液**。

(2) **不破碎直接水解 (适用于细胞总数相近或不考虑细胞总数的样本):** 每管中加入碱溶液 0.25mL, 沸水浴 20 分钟, 流水冷却, 加双蒸水 0.25mL, 即为**糖元检测液**。

五、操作表:

| | 空白管 | 标准管 | 测定管 |
|--|-----|-----|-----|
| 双蒸水(mL) | 1.0 | 0.9 | 0.9 |
| 0.1mg/mL 标准(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。

六、计算公式:

1、组织样本计算公式:

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

$C_{\text{标准}}$: 标准液浓度, 0.1mg/mL;

$C_{\text{水解液}}$: 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% 浓度的, 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 100 μ g 糖原用蒽酮试剂显色的颜色相当于 111 μ g 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:

$$\text{糖元含量 (mg/mgprot)} = \frac{A_{\text{测定}}}{A_{\text{标准}}} \times C_{\text{标准}} \div 1.11 \div C_{\text{pr}}$$

② 不破碎直接水解的细胞计算:

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

$C_{\text{标准}}$: 标准品浓度, 0.1mg/mL;

C_{pr} : 细胞匀浆蛋白浓度, mgprot/mL (prot 指蛋白);

$V_{\text{样总}}$: 制备得到的糖元检测液总体积, 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 100 μ g 糖原用蒽酮试剂显色的颜色相当于 111 μ g 葡萄糖用蒽酮试剂显色的颜色。

七、计算举例:

例 1: 取小鼠肝脏按上述步骤操作, 测得标准管 OD 值为 0.174, 测定管 OD 值为 0.223,

计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{小鼠肝糖元含量} &= \frac{0.223}{0.174} \times 0.1 \div 0.01 \div 1.11 \\ (\text{mg/g 肝组织}) & \\ &= 11.546 \text{ mg/g 肝组织} \end{aligned}$$

例 2: 取小鼠肌肉按上述步骤操作, 测得标准管 OD 值为 0.174, 测定管 OD 值为 0.171, 计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{小鼠肌糖元含量} &= \frac{0.171}{0.174} \times 0.1 \div 0.05 \div 1.11 \\ (\text{mg/g 肌肉组织}) & \\ &= 1.771 \text{ mg/g 肌肉组织} \end{aligned}$$

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，称重（样本重量≤100mg为宜，不要>100mg）。
- 2、水解：**按样本重量（mg）：碱液体积（μL）=1：3，一起加入试管中，沸水浴煮 20min，流水冷却。
- 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%，加双蒸水的量为：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），加入一定量的氯仿，可按照检测液量(mL)：氯仿(mL)=4:1,漩涡混匀，3500 转/分钟离心 10 分钟，取上清用于测定（如含量较高，需稀释后再测定）。

二、操作表：

| | 空白管 | 标准管 | 测定管 |
|--|-----|-----|-----|
| 双蒸水(mL) | 1.0 | 0.9 | 0.9 |
| 0.1mg/mL 标准(mL) | | 0.1 | |
| 糖原检测液(mL) | | | 0.1 |
| 显色液(mL) | 2 | 2 | 2 |
| 混匀后置沸水中煮 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、计算与举例：

1、计算公式：

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

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。

2、计算举例：

取脂肪肝模型大鼠肝脏按上述附录中步骤操作，测得标准管 OD 值为 0.174，测定管 OD 值为 0.348，计算结果为：

$$\begin{aligned} \text{大鼠肝糖元含量 (mg/g 肝组织)} &= \frac{0.348}{0.174} \times 0.1 \div 0.05 \div 1.11 \\ &= 3.603 \text{ mg/g 肝组织} \end{aligned}$$