**实验四 小鼠肝糖原肌糖原含量的测定---蒽酮法**

一、实验目的

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。

二、实验原理

蒽酮法：利用强碱性提取液提取糖原（糖原溶于热强碱溶液，其它糖类被破坏），糖原在强酸中水解为葡萄糖，葡萄糖遇浓硫酸后脱水生成糠醛衍生物，此化合物与蒽酮试剂脱水缩合产生蓝绿色物质，该物质在可见光区620nm波长处有最大吸收，且其光吸收值在一定范围内与葡萄糖的含量成正相关。此法可用于可溶性单糖、寡糖和多糖的含量测定，并具有灵敏度高、简便快捷、适用于微量样品的测定等优点。

三、试剂和器材

试剂：

提取液：30%氢氧化钠提取液50mL×1瓶，4℃保存；5-

试剂一：0.1mg/mL 的葡萄糖标准液 10mL×1瓶，4℃保存；

试剂二：蒽酮粉剂×1瓶， 4℃保存；

浓硫酸和蒸馏水

实验动物：小鼠

器材：

剪刀镊子、电子天平、可调式移液器、研钵、15ml离心管、水浴锅、普通低速离心机、1mL比色皿、可见分光光度计。

四、实验方法

1. 样品处理：

1）解剖小鼠肝脏和肌肉组织，称取0.1样品，加入0.5ml提取液充分匀浆；

2）转移匀浆液至15ml塑料离心管中，并用0.5ml提取液洗涤研钵残留入离心管，95℃水浴20min（盖紧，防止水分散失），隔5min振摇试管1次，使充分混匀；

3）取出试管冷却后用蒸馏水定容到5ml，混匀，4000RPM 常温离心10min，取上清液待测。

2. 指标测定：

1）分光光度计预热30min以上，调节波长至620nm，蒸馏水调零。

2）调节水浴锅至95℃。

3）试剂二工作液的配制：在试剂二中加入10mL蒸馏水，缓慢倒入40mL浓硫酸，充分溶解混匀后使用（用不完的试剂4℃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 |
| 糖原提取液 |  |  | 250 |
| 试剂一 |  | 250 |  |
| 蒸馏水 | 250 |  |  |
| 试剂二工作液 | 1000 | 1000 | 1000 |

混匀，95℃水浴10min（盖紧，防止水分散失），冷却，于620nm波长处，以空白管调零，分别读取标准管吸光度A1和测定管吸光度A2。

注意：1.如果A2-A1大于2，需要将待测上清液用蒸馏水稀释，计算公式中乘以相应稀释倍数；

2.最低检测限为10ng/g鲜重。

五、实验结果

糖原含量计算：

糖原（mg/g鲜重）＝1.11×(C标准×V1)×A2÷A1÷(W×V1÷V2)= 0.555×A2÷A1÷W

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：葡萄糖标准液浓度，0.1mg/mL；V1：加入反应体系中葡萄糖标准液、糖原提取液的体积，0.25mL；V2：提取液体积，5mL； W：样本鲜重，g。

六、实验分析