

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号：E-BC-F040

产品规格：96T(40 samples)

检测仪器：荧光酶标仪(激发光波长 535 nm，发射光波长 587 nm)

Elabscience®糖原荧光法测试盒

Glycogen Fluorometric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测动物肝脏、肌肉组织和细胞样本中的糖原含量。

检测原理

糖原在淀粉糖苷酶的作用下产生葡萄糖，葡萄糖经葡萄糖氧化酶催化生成过氧化氢。随后过氧化氢在过氧化物酶作用下，将无荧光的探针氧化为有荧光的物质，其荧光强度与糖原的含量有关。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 A (Buffer Solution A)	30 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	缓冲液 B (Buffer Solution B)	8 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	探针 (Probe)	0.24 mL×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	酶试剂 A (Enzyme Reagent A)	粉剂×1 支	-20℃ 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	酶试剂 B (Enzyme Reagent B)	粉剂×1 支	-20℃ 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	0.1 mg/mL 糖原标准品溶液 (0.1 mg/mL Glucogen Standard Solution)	0.5 mL×1 支	-20℃ 保存 6 个月
	96 孔黑色酶标板	1 板	
	96 孔覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 张	

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：荧光酶标仪(激发光波长 535 nm, 发射光波长 587 nm)、恒温箱

试剂准备

① 检测前，所有试剂需平衡至室温。

② 试剂四工作液的配制：

每支试剂四粉剂用1.2 mL试剂一充分溶解，临用前配制，分装后-20℃可保存7天。

③ 试剂五工作液的配制：

每支试剂五粉剂用0.24 mL试剂二充分溶解，临用前配制，分装后2-8℃可保存7天。

④ 25 μg/mL糖原标准品的配制：

取100 μL 0.1 mg/mL的糖原标准品溶液加入到300 μL的试剂一中，混匀即可。

⑤ 反应工作液的配制：

按试剂二：试剂三：试剂五工作液体积比为46：2：2的比例混匀，临用前按需配制，现配现用，注意避光放置。

⑥ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(μg/mL)	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0
25 μg/mL标准品(μL)	0	10	20	30	40	50	60	80
试剂一(μL)	500	490	480	470	460	450	440	420

样本准备

① 样本处理

细胞样本：取 10^6 个细胞样本用 200 μL 双蒸水低温匀浆 60 s，然后 95°C 水浴 10 min，流水冷却， 4°C ， $12000 \times g$ 离心 10 min，取上清液待测（样本匀浆后应立即水浴，不要放置）。

动物组织样本：按组织重量：双蒸水=0.1 g : 0.9 mL 比例进行匀浆，低温匀浆 60 s， 95°C 水浴 10 min，冰水冷却， 4°C ， $12000 \times g$ 离心 10 min，取上清液待测。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.06-4.0 $\mu\text{g/mL}$ ，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%小鼠肝组织 匀浆	3000-5000	10%小鼠肌肉组 织匀浆	10-20

注：稀释液为试剂一；肝样本稀释倍数较大可分步稀释。

实验关键点

① 反应工作液配好后，必须要避光放置。

② 水浴加热温度控制在 95°C 以上。

③ 由于动物死后组织中仍会有较快的无氧代谢速率，因此组织内的葡萄糖含量会迅速下降到无法检测到的水平，导致糖原被进一步水解，含量大幅度下降。要想准确的测量组织中的糖原，若不能即取即测，则需要将样本取出后采取有效的灭活手段，可立即将组织移至液氮中，然后在液氮中研磨并在 -20 或 -80°C 保存。

操作步骤

- ① 标准孔：向酶标板对应的标准孔中加入 50 μL 的不同浓度标准品。
测定孔：向酶标板对应的测定孔中加入 50 μL 的待测样本。
对照孔：向酶标板对应的对照孔中加入 50 μL 的待测样本。
- ② 向步骤①对应的标准孔和测定孔中加入 20 μL 的试剂四工作液。
向步骤①对应的对照孔中加入 20 μL 的试剂一
- ③ 向步骤②各孔中加入 50 μL 的反应工作液。
- ④ 酶标仪上振板 5 s，室温条件下，避光静置 30 min，荧光酶标仪上设置激发光波长 535 nm，发射光波长 587 nm，测定各孔荧光值，记测定孔荧光值为 F_1 ，对照孔荧光值为 F_2 。

操作表

	标准孔	测定孔	对照孔
待测样本(μL)	--	50	50
不同浓度标准品(μL)	50	--	--
试剂四工作液(μL)	20	20	--
试剂一(μL)	--	--	20
反应工作液(μL)	50	50	50
酶标仪上振板 5 s，室温条件下，避光静置 30 min，荧光酶标仪上设置激发光波长 535 nm，发射光波长 587 nm，测定各孔荧光值，记测定孔荧光值为 F_1 ，对照孔荧光值为 F_2 。			

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

细胞中糖原含量的计算:

$$\text{糖原含量} \left(\frac{\mu\text{g}}{10^6} \right) = (\Delta F - b) \div a \times f \div \frac{n}{V_1}$$

肝脏、肌肉组织中糖原含量的计算:

$$\text{糖原含量} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mg wet weight}} \right) = (\Delta F - b) \div a \times f \div \frac{m}{V_2}$$

注解:

y: 标准品荧光值-空白荧光值(标准品浓度为 0 的荧光值)

x: 荧光值对应的浓度

a: 标准曲线斜率

b: 标准曲线截距

ΔF : 样本的荧光变化值($F_1 - F_2$) - 空白荧光值(标准品浓度为 0 的荧光值)

f: 待测样本加入反应体系前的稀释倍数

m: 组织湿重(100 mg)

n: n 个 10^6 细胞

V_1 : 细胞处理时加入双蒸水的体积(mL), 建议每 10^6 个细胞加入 0.2 mL

V_2 : 组织处理过程中加入双蒸水的体积(mL)

附录1 关键数据

1. 技术参数

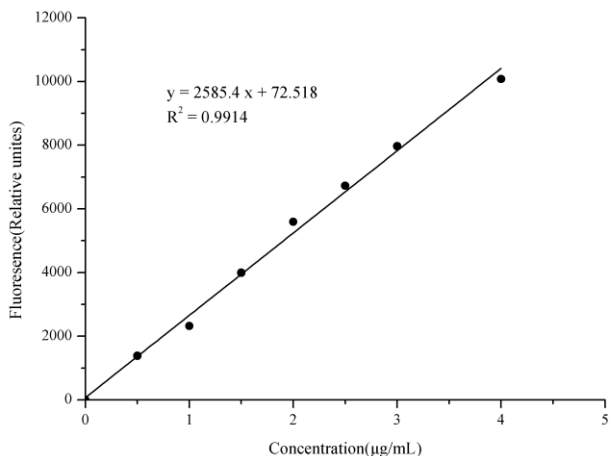
检测范围	0.06-4.0 µg/mL	平均批间差	6.6 %
灵敏度	0.06 µg/mL	平均批内差	3.4 %

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度的标准品加样量50 µL，按照操作步骤进行实验，读取各点荧光值如下表所示：

标准品浓度 (µg/mL)	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0
荧光值	1269	2695	3650	5304	6826	8119	9197	11360
	1257	2599	3519	5209	6885	7861	9271	11325
平均荧光值	1263	2647	3585	5257	6856	7990	9234	11343
绝对荧光值	0	1384	2322	3994	5593	6727	7971	10080

②绘制标曲(如下图)：



附录2 实例分析

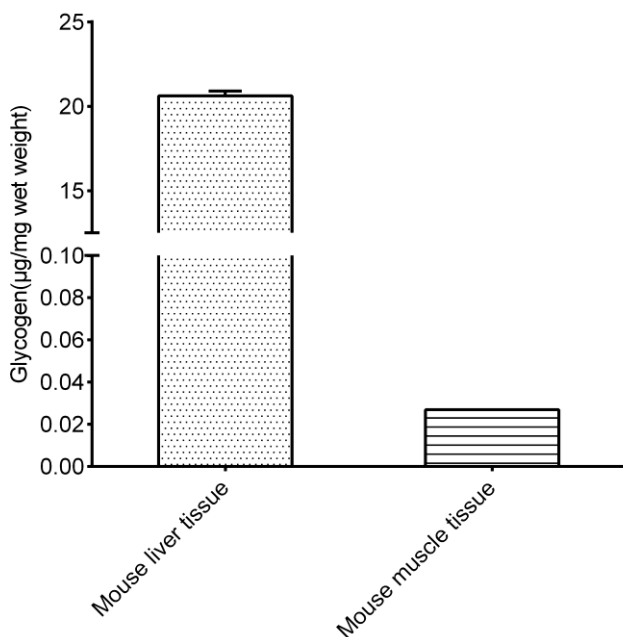
例如检测10%小鼠肝组织组织匀浆(数据仅供参考):

新鲜小鼠肝组织匀浆离心后,取稀释4000倍的10%小鼠肝组织匀浆上清50 μL ,加入到酶标板相应的测定孔和对照孔中,按操作表检测,结果如下:

标准曲线: $y = 2283x + 106.49$, 测定孔平均荧光值为3961, 记为 F_1 , 对照孔平均荧光值为1103, 记为 F_2 , 空白孔平均荧光值为1444, 则 $\Delta F = 3961 - 1103 - 1444 = 1414$, 计算结果为:

$$\text{糖原含量} (\mu\text{g}/\text{mg wet weight}) = (1414 - 106.49) \div 2283 \times 4000 \div \frac{100}{0.9} = 20.62 \mu\text{g}/\text{mg wet weight}$$

按照说明书,测定10%小鼠肝组织(稀释4000倍,加样量50 μL)、10%小鼠肌肉组织(稀释10倍,加样量50 μL)中的糖原含量(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
测值不稳定, 复孔差异大	加样时间过长	尽可能的缩短加样时间
样本测不出值	样本稀释倍数不合适	可进行预实验, 选择合适的稀释倍数重新测定
	样本保存时间过长或者保存不当	必须取新鲜样本进行检测

声明

1. 试剂盒仅供研究使用, 如将其用于临床诊断或任何其他用途, 我公司将不对因此产生的问题负责, 亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器, 严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低, 请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中, 建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责, 不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责, 使用前请充分考虑样本可能的使用量, 预留充足的样本。

附录4 客户发表文献

1. Mu X, Xiang Z, Xu Y, et al. Glucose metabolism controls human $\gamma\delta$ T-cell-mediated tumor immunosurveillance in diabetes[J]. Cellular & Molecular Immunology. IF:22.096
2. Tseng S.Ja. An acid degradable, lactate oxidizing nanoparticle formulation for non-small cell lung cancer virotherapy[J]. Nano Today. IF:18.962
3. Zhang H, Zheng Q, Guo T, et al. Metabolic reprogramming in astrocytes results in neuronal dysfunction in intellectual disability. Mol Psychiatry. 2022. IF:15.992
4. Salman T M, Iyanda M A, Alli-Oluwafuyi A M, et al. Telfairia occidentalis stimulates hepatic glycolysis and pyruvate production via insulin-dependent and insulin-independent mechanisms[J]. Metabolism Open, 2021, 10(1-10):100092. IF:8.694
5. Li Q, Peng J, Luo Y, et al. Far infrared light irradiation enhances A β clearance via increased exocytotic microglial ATP and ameliorates cognitive deficit in Alzheimer's disease-like mice. J Neuroinflammation. 2022; 19 (1):145. IF:7.573
6. Zeng X Peng, Wang L J, Guo L H, et al. Dasatinib ameliorates chronic pancreatitis induced by caerulein via anti- fibrotic and anti-inflammatory mechanism[J]. Pharmacological Research, 2019, 147, 104357. IF:5.574
7. Daily Dose of Bovine Lactoferrin Prevents Ethanol-Induced Liver Injury and Death in Male Mice by Regulating Hepatic Alcohol Metabolism and Modulating Gut Microbiota[J]. Molecular Nutrition & Food Research. IF:5.426
8. Wang Y, Xie W, Feng Y, et al. Epithelial-derived exosomes promote M2 macrophage polarization via Notch2/SOCS1 during mechanical ventilation. Int J Mol Med. 2022; 50 (1). IF:5.314
9. Yu C, Wang D, Tong Y, et al. Trans -Anethole Alleviates Subclinical Necro-Haemorrhagic Enteritis-Induced Intestinal Barrier Dysfunction and Intestinal Inflammation in Broilers. Front Microbiol. 2022; 13:831882. IF:5.259
10. Xu Y , Zhang Y , Xu Y , et al. Activation of CD137 signaling promotes macrophage apoptosis dependent on p38 MAPK pathway-mediated mitochondrial fission[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2021 Jul; 136:106003. IF:5.085
11. Naseh A, Shirin B, Maryam M, et al. Attenuation of chronic arsenic neurotoxicity via melatonin in male offspring of maternal rats exposed to arsenic during conception: Involvement of oxidative DNA damage and inflammatory signaling cascades[J]. Life Sciences 266 (2021) 118876. IF:5.037

12. Zhong J, Sun P, Xu N, et al. Canagliflozin inhibits p-gp function and early autophagy and improves the sensitivity to the antitumor effect of doxorubicin[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2020, 175: 113856. IF:4.96
13. Wang L J, He L, Hao L, et al. Isoliquiritigenin ameliorates caerulein-induced chronic pancreatitis by inhibiting the activation of PSCs and pancreatic infiltration of macrophages[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020. IF:4.486
14. Laurian R, Ravent J, Dementhon K, et al. *Candida albicans* Hexokinase 2 Challenges the *Saccharomyces cerevisiae* Moonlight Protein Model[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(4):848. IF:4.128
15. Liu J, Duan P, Xu C Y, et al. CircRNA circ-ITCH improves renal inflammation and fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice by regulating the miR-33a-5p/SIRT6 axis[J]. *Inflammation Research*, 2021. IF:4.114
16. Yu H, Zhang L, Chen P, et al. Dietary bile acids enhance growth, and alleviate hepatic fibrosis induced by a high starch diet via AKT/FOXO1 and cAMP/AMPK/SREBP1 pathway in *Micropterus salmoides*[J]. *Frontiers in Physiology*, 2019, 10. IF:3.367
17. Sohini Sen, Shaunak Ghosh, Sayantan De, et al. Immunomodulatory and antimicrobial non-mulberry *Antheraea mylitta* silk fibroin accelerates in vitro fibroblast repair and regeneration by protecting oxidative stress[J]. *RSC Advances*, 2021 May; 11(31):19265-19282. IF:3.361
18. Li Jianda, Yuan Chen, Liu Peng et al. Red blood cells serve as a vehicle for PEDV transmission.[J]. *Vet Microbiol*, 2021, 257: 109081. IF:3.293
19. Ali A, Elsherbiny D, Azab S, et al. The diuretic amiloride attenuates doxorubicin-induced chemobrain in rats: Behavioral and mechanistic study[J]. *Neurotoxicology*, 2021, 88:1-13. IF:3.088
20. Yang H, Gan S, Jiang Z, et al. Protective effects of essential oil from *Fructus Alpiniae zerumbet* on retinal Müller gliosis via the PPAR- γ -p-CREB signaling pathway[J]. *Chinese Medicine*, 2020, 15(1): 4. IF:2.96
21. Chen Wenqi, Li Yuehua, Zhong Jing et al. circ-PRKCI targets miR-1294 and miR-186-5p by downregulating FOXK1 expression to suppress glycolysis in hepatocellular carcinoma.[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23: undefined. IF:2.952
22. Cui Y, Wang Y, Liu G. Protective Effect of Barbaloin in a Rat Model of Myocardial Ischemia Reperfusion Injury Through the Regulation of the CNPY2 \rightarrow PERK Pathway[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2019. IF:2.928

23. Li H, Xia T, Guan Y, et al. Sevoflurane Regulates Glioma Progression by Circ_0002755/miR-628-5p/MAGT1 Axis[J]. *Cancer Management and Research*, 2020, 12: 5085. IF:2.886
24. Cheng F, Yu J, Zhang X, et al. CircSEC31A Promotes the Malignant Progression of Non-Small Cell Lung Cancer Through Regulating SEC31A Expression via Sponging miR-376a[J]. *Cancer Management and Research*, 2020, Volume 12:11527-11539. IF:2.886
25. Sanjeev S, Murthy M K, Devi M S, et al. Isolation, characterization, and therapeutic activity of bergenin from marlberry (*Ardisia colorata* Roxb.) leaf on diabetic testicular complications in Wistar albino rats[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019: 1-20. IF:2.8
26. Dede A, Arslanyolu M. The in vivo *Tetrahymena thermophila* extracellular glucose drop assay for characterization of mammalian insulin activity[J]. *European Journal of Protistology*, 2021, 79(1):125803. IF:2.432
27. Wang F, Chen H, Chen Y, et al. Diet-induced obesity is associated with altered expression of sperm motility-related genes and testicular post-translational modifications in a mouse model[J]. *Theriogenology*, 2020. IF:2.094
28. Bhargava P, Verma V K, Malik S, et al. Hesperidin Regresses Cardiac Hypertrophy by Virtue of PPAR- γ Agonistic, Anti-Inflammatory, Antiapoptotic, and Antioxidant Properties[J]. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 2019: e22283. IF:1.837
29. Adeyemi W J, Abdussalam T A, Abdulrahim A, et al. Elevated, sustained, and yet reversible biotoxicity effects of lead on cessation of exposure: Melatonin is a potent therapeutic option[J]. *Toxicology and Industrial Health*, 2020, 36(7): 477-486. IF:1.708
30. Ustunova S, Takir S, Yilmazer N, et al. Hydrogen sulphide and nitric oxide cooperate in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in isolated rat heart[J]. *in vivo*, 2020, 34(5): 2507-2516. IF:1.541