

糖原合成酶 (Glycogen synthase, GCS) 试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

注 意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

GCS (EC 2.4.1.11) 催化 UDPG 和葡萄糖残基生成糖原和 UTP，以 α -1, 4-糖苷键相连延长糖链，是肝和肌肉糖原合成酶的限速酶，是胰岛素作用的主要靶酶，对糖代谢的调节和血糖稳态的维持具有重要作用。

测定原理：

GCS 催化 UDPG 和葡萄糖残基生成糖原和 UDP，丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶进一步依次催化 NADH 氧化生成 NAD^+ ，在 340nm 下测定 NADH 下降速率，即可反映 GCS 活性。

需自备的仪器和用品：

分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

提取液：100mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：液体 18 mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：液体 2.5mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂三：液体 16.4 μ L×1 支，4℃ 保存；

试剂四：粉剂×1 支，-20℃ 保存；

试剂五：粉剂×1 支，-20℃ 保存；

样本的前处理：

按照组织质量 (g)：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），进行冰浴匀浆。8000g 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤：

- 1、 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- 2、 工作液的配制：临用前将试剂三和试剂四转移到试剂一中混合溶解待用；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融。
- 3、 试剂五的配制：临用前在试剂五中加入 1mL 试剂二充分溶解待用；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融。
- 4、 将工作液和试剂五置于 37℃ 预热 5 分钟。
- 5、 在 1mL 微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10 μ L 样本、10 μ L 试剂五和 180 μ L 工作液，立即混匀，记录 340nm 处初始吸光值 A1 和 1min 后的吸光值 A2，计算 $\Delta A=A1-A2$ 。

注意：在该试剂盒中，若 ΔA 大于 0.1，需将样本用提取液稀释适当倍数后测定，使 ΔA 小于 0.1 可提高检测灵敏度。计算公式中乘以相应稀释倍数。

GCS 活性计算：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GCS (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 3215 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位定义：每 g 组织每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GCS (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3215 \times \Delta A \div W$$

V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol /cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，1 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GCS (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 6430 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位定义：每 g 组织每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GCS (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 6430 \times \Delta A \div W$$

V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol /cm；d：96 孔板光径，0.5cm；V 样：加入样本体积，0.01mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，1 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g。