

糖原合成酶（Glycogen synthase, GCS）试剂盒说明书

微量法 100管/96样

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。

$$\text{GCS (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 3215 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{GCS (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3215 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\text{GCS (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 6430 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{GCS (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 6430 \times \Delta A \div W$$

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。