

糖原合酶 (Glycogen synthase, GCS) 试剂盒说明书

(货号: G0562W 微板法 96 样)

一、产品简介:

糖原合酶 (GCS, EC 2.4.1.11) 将 UDP-G 糖基加到葡萄糖残基上, 以 α -1, 4-糖苷键相连延长糖链, GCS 是糖原合成的限速酶, 对糖代谢和血糖稳态的维持具有重要作用。

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的逐一作用下, 使 NADH 氧化为 NAD^+ , 通过检测 NADH 在 340nm 处的下降量来计算 GCS 酶活大小。

二、试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 1.2mL 蒸馏水充分溶解备用。
试剂二	粉剂 mg×4 支	-20℃保存	每支用前甩几下使试剂落入底部, 再加 0.3mL 的蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂三	粉剂 mg×2 支	-20℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 每支再加 0.6mL 蒸馏水充分溶解备用, 可分装冻存, 禁止反复冻融。
试剂四	粉剂 mg×2 支	-20℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 每支再加 0.6mL 蒸馏水充分溶解备用, 可分装冻存, 禁止反复冻融。
试剂五	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂六	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 1.2mL 蒸馏水充分溶解备用。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、糖原合酶 (GCS) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm 4℃离心 15min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例提取

② 细胞样本:

先收集细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细胞加入 1mL 提取液; 超声波破碎细胞 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 4℃ 约 12,000rpm 离心 10min, 取上清作为待测样品。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测：

- ① 酶标仪预热 30min 以上，设置温度 30℃,调节波长至 340nm。
- ② 所有试剂放在 30℃水浴 5-15min；
- ③ 试剂一和三和四和五可按照 10:10:10:130 比例配成混合液（一枪加 160μL）（用多少配多少，现配现用），在 96 孔板中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管
样本	20
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	10
试剂四	10
试剂五	130
混匀，30℃下孵育 5min。	
试剂六	10
混匀，30℃下，2min 时于 340nm 处读取吸光值 A1，22min 时读取 A2， $\Delta A=A1-A2$ 。	

- 【注】：**1.若 ΔA 过小，可以延长反应时间 T（如：32min 或更长）再读取 A2，或增加样本加样量 V1（如增至 40μL，则试剂五相应减小），重新调整的反应时间 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。
- 2.若 A2 值小于 0.45，则需缩短反应时间 T（如减至 12min）再读取 A2 或减少样本量 V1（如减至 10μL，则试剂五相应增加），重新调整的反应时间 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

- 1、按样本蛋白浓度计算：

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

$$GCS(nmol/min/mg \text{ prot})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T=160.8 \times \Delta A \div Cpr$$

- 2、按样本鲜重计算：

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

$$GCS(nmol/min/g \text{ 鲜重})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T=160.8 \times \Delta A \div W$$

- 3、按细胞密度计算：

单位定义：每 1 万个细胞每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$GCS(nmol/min/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T=0.323 \times \Delta A$$

- 4、按液体体积计算：

单位定义：每毫升液体每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$GCS(nmol/min/mL)=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T=160.8 \times \Delta A$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ；

d---96 孔板光径，0.5cm；

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.02mL；

V2---反应体系总体积， $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

T---反应时间，20 min；

W---样本质量，g；

500---细胞数量，万；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。