

## 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 $\alpha$ -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<sup>+</sup>，在 340nm 下测定 NADH 下降速率，即可反映 GCS 活性。

### 组成：

产品名称	GCS002-100T/96S	Storage
提取液：液体	100ml	4°C
试剂一：液体	18ml	4°C
试剂二：液体	2.5ml	4°C
试剂三：液体	16.4 $\mu$ l	4°C
试剂四：粉剂	1 支	-20°C
试剂五：粉剂	1 支	-20°C
说明书	一份	

### 自备仪器和用品：

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。

### 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°C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°C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°C保存，禁止反复冻融。

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司，保留一切权利



4、将工作液和试剂五置于 37°C 预热 5 分钟。

5、在 1ml 微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10μl 样本、10μl 试剂五和 180μl 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  $\Delta A$  大于 0.1, 需将样本用提取液稀释适当倍数后测定, 使  $\Delta A$  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,  $2 \times 10^{-4}$  L;  $\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3$  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,  $2 \times 10^{-4}$  L;  $\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3$  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。

