

## 糖原合酶（Glycogen synthase, GCS）试剂盒说明书 (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 $\alpha$ -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<sup>+</sup>，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×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。
试剂四	液体 15mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂五	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<sup>4</sup>)：提取液 (mL) 为 500~1000：1 的比例进行提取。

#### 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 试剂放在 30℃ 水浴 5min；

③ 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	140
混匀, 30°C下孵育 5min。	
试剂五	10
混匀, 30°C下, 2min 时于 340nm 处读取吸光值 A1, 22min 时读取 A2, $\Delta A=A1-A2$ 。	

- 【注】:** 1.若 $\Delta A$  过小, 可以延长反应时间(如: 32min 或更长)再读取 A2, 或增加样本加样量 V1 (如增至 40μL, 则试剂四相应减小), 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, 则试剂四相应增加), 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。

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

### 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。

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

### 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。

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

$\epsilon$ ---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;

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。