

糖原合成酶（GCS）活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

货号：AC10580

规格：50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 40 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	液体 15 mL×1 瓶	4°C保存
试剂三	液体 36 μL×1 支	4°C保存
试剂四	粉剂×1 支	-20°C保存
试剂五	粉剂×1 支	-20°C保存
试剂六	液体 115 μL×1 支	4°C保存
试剂七	粉剂×1 支	-20°C保存
试剂八	粉剂×1 瓶	4°C保存

溶液的配制：

- 1、工作液的配制：临用前将试剂三、试剂四和试剂五转移到试剂一中混合溶解后待用；用不完的试剂分装后-20°C保存，避免反复冻融，-20°C保存1周。
- 2、试剂八的配制：临用前在试剂八中加入12 mL 试剂二充分溶解，再将试剂六和试剂七转移到试剂八中混合溶解后待用；用不完的试剂分装后-20°C保存，避免反复冻融，-20°C保存1周。

产品说明：

糖原合成酶（Glycogen synthase, GCS）将UDPG的糖基加到原有糖原或是糖原蛋白的非还原端，以 α -1,4糖苷键连接。GCS是动物机体糖原合成过程的限速酶，同时也是胰岛素作用的主要靶酶，在糖代谢及维持血糖相对稳定的过程中有着重要作用。

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进一步依次催化NADH生成NAD⁺，在340 nm下测定NADH的下降速率，即可反映GCS活性。

注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、低温台式离心机、水浴锅、1mL石英比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤：**一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）**

组织：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，然后，8000g，4°C离心10min，取上清置于冰上待测。

细菌或细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细胞数量（ 10^4 个）:提取液体积（mL）为500~1000:1的比例（建议500万细菌或细胞加入1mL提取液），冰浴超声波破碎细菌或细胞（功率200w，超声3秒，间隔7秒，总时间3min）；然后8000g，4℃，离心10min，取上清置于冰上待测。

血清等液体：直接检测。

二、测定步骤

- 1、分光光度计预热30min以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。
- 2、临用前将工作液与试剂八置于37℃水浴锅中预热5min（工作液用多少预热多少）。
- 3、操作表：在1mL石英比色皿中分别加入下列试剂：

试剂名称（ μL ）	空白管	测定管
样本		50
蒸馏水	50	
工作液	750	750
试剂八	200	200

加入样本即开始计时，充分混匀后于340nm处测定10s时的吸光值A1和1min10s时的吸光值A2，计算 ΔA 测定管=A1测定-A2测定， ΔA 空白管=A1空白-A2空白， $\Delta A = \Delta A$ 测定管- ΔA 空白管（空白管只需做1-2次）。

三、GCS酶活计算

1. 按蛋白浓度计算

酶活定义：每毫克蛋白每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{GCS酶活 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 3215.4 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2. 按样本质量计算

酶活定义：每克样本每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{GCS酶活 (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 3215.4 \times \Delta A \div W$$

3. 按细菌或细胞数量计算

酶活定义：每 10^4 个细胞每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{GCS酶活 (U}/10^4 \text{ cell)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量 (万个)}) \div T \\ &= 3215.4 \times \Delta A \div \text{细胞数量 (万个)} \end{aligned}$$

4. 按液体体积计算

酶活定义：每毫升液体每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{GCS酶活 (U/mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div V_{\text{样}} \div T = 3215.4 \times \Delta A$$

ϵ : NADH摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 比色皿光径, 1 cm ; 10^9 : 单位换算系数, $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $1 \times 10^{-3} \text{ L}$; $V_{\text{样}}$: 反应体系中样本体积, 0.05 mL ; C_{pr} : 样本蛋白浓度, mg/mL ; W : 样本质量, g ; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 mL ; T : 反应时间: 1 min 。

注意事项:

- 1、样本提取上清液置于冰上待测，提取样本建议当天测完。
- 2、若 ΔA 大于0.2，建议将样本用提取液稀释适当倍数后测定，以提高检测灵敏度，并在计算公式中乘以相应的稀释倍数。

实验实例：

- 1、取0.1g小鼠心脏加入1mL提取液进行样本处理，取上清后按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A_{\text{测定管}} = A1_{\text{测定}} - A2_{\text{测定}} = 1.177 - 1.119 = 0.058$ ， $\Delta A_{\text{空白管}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}} = 0.944 - 0.939 = 0.005$ ， $\Delta A = \Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}} = 0.058 - 0.005 = 0.053$ ，按照样本质量计算酶活得：
GCS酶活（U/g 质量） $= 3215.4 \times \Delta A \div W = 1704.162$ U/g 质量。