

上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

糖原合成酶（GCS）检测试剂盒说明书

微量法

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（UV板）、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制

| 种类 | 试剂规格 | 储存条件 | 使用方法及注意事项 |
|-----|--------------|--------|-----------|
| 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×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；现配现用；
- 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；现配现用；
- 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（UV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。

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

$$= 3215 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位定义: 每g组织每分钟消耗1nmol 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, 2×10^{-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, 1min; 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1nmol 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, 2×10^{-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。