

Glycogen Synthase Activity Kit

糖原合酶（GCS）试剂盒说明书

货号:BN72473 | 方法: 微板法 | 规格: 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°C, 调节波长至 340nm。

② 所有试剂放在 30°C 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 160 μ L) (用多少配多少, 现配现用), 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μ L)	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°C 下孵育 5min。	
试剂六	10
混匀, 30°C 下, 2min 时于 340nm 处读取吸光值 A1, 22min 时读取 A2, $\Delta A = A1 - A2$ 。	

注意: 本操作流程适用于绝大多数常规样本检测, 实验条件可根据实际样本状态适度微调;

针对特殊类型样本, 我司技术支持可提供专属优化建议。

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。