

## 糖原合成酶（GCS）检测试剂盒（微量法）

**注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。**

### 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。

### 试剂组成和配制：

提取液：液体 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 16.4uL×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；用不完的试剂分装后-20℃ 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℃ 保存，禁止反复冻融。
- 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 孔板中加入 10 $\mu$ L 样本、10 $\mu$ L 试剂五和 180 $\mu$ 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 $\Delta A$  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。

$$\begin{aligned} \text{GCS (nmol/min/mg prot)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 3215 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

#### (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。

$$\begin{aligned} \text{GCS (nmol/min/g 鲜重)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 3215 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{GCS (nmol/min/mg prot)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 6430 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

#### (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。

$$\begin{aligned} \text{GCS (nmol/min/g 鲜重)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 6430 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

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。