

糖原合酶（Glycogen synthase, GCS）试剂盒说明书

（货号：BP10335W 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉剂 1 支	-20℃ 保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使粉剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 加入 1.2mL 蒸馏水充分溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉剂 4 支	-20℃ 保存	每支： 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使粉剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 加入 0.3mL 的蒸馏水溶解备用； 3. 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 2 支	-20℃ 保存	每支： 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使粉剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 每支再加 0.6mL 蒸馏水充分溶解备用； 3. 可分装冻存，禁止反复冻融。
试剂四	粉剂 2 支	-20℃ 保存	每支： 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使粉剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 每支再加 0.6mL 蒸馏水充分溶解备用； 3. 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 1 支	-20℃ 保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使粉剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 加入 1.2mL 蒸馏水充分溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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（10⁴）：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、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min 以上，设置温度 30℃,调节波长至 340nm。

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

试剂组分（μL）	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℃下孵育 5min。	
试剂六	10
混匀，30℃下，2min 时于 340nm 处读取吸光值 A1，22min 时读取 A2， $\Delta A=A1-A2$ 。	

【注】：1.若 ΔA 过小，可以延长反应时间 T（如：32min 或更长）再读取 A2，或增加样本加样量 V1（如增至 40μL，则试剂五相应减小），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，则试剂五相应增加），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。

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

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。

$$\text{GCS}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.323 \times \Delta A$$

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。

$$\text{GCS}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div V_1 \div T = 160.8 \times \Delta A$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$;

d ---96 孔板光径, 0.5cm ;

V ---加入提取液体积, 1 mL ;

V_1 ---加入样本体积, 0.02mL ;

V_2 ---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;

C_{pr} ---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。