

糖原合成酶 (Glycogen synthase, GCS) 试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

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、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制:

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 16.4 μ L×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 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 1 nmol 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, 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。

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

(2) 按样本鲜重计算

单位定义: 每 g 组织每分钟消耗 1 nmol 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。