

## $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶 ( $\gamma$ -GCS) 活性测定试剂盒

(货号: G0214F 分光法 48 样)

### 一、产品简介:

$\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶( $\gamma$ -GCS, EC 6.3.2.2)是谷胱甘肽(GSH)合成中的限速酶,催化谷氨酸和半胱氨酸合成 $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸( $\gamma$ -GC)。有研究表明该酶在细胞的氧化应激过程中具有一定作用。

在 ATP、镁离子存在下,  $\gamma$ -GCS 催化谷氨酸和半胱氨酸合成 $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸( $\gamma$ -GC), 同时 ATP 去磷酸化产生无机磷分子, 通过测定无机磷增加速率, 即可计算出 $\gamma$ -GCS 活性。

### 二、测试盒组成和配制:

| 试剂名称 | 规格                          | 保存要求   | 备注                                               |
|------|-----------------------------|--------|--------------------------------------------------|
| 提取液  | 液体 50mL×1 瓶                 | 4℃保存   |                                                  |
| 试剂一  | 液体 30mL×1 瓶                 | 4℃保存   |                                                  |
| 试剂二  | 粉体 mg×1 支                   | -20℃保存 | 临用前甩几下使粉末全部落入底部, 加入 2.2mL 的试剂一, 混匀溶解备用。          |
| 试剂三  | 粉体 mg×1 支                   | 4℃保存   | 临用前甩几下使粉末全部落入瓶底, 加入 4.4mL 的试剂一, 混匀溶解备用。          |
| 试剂四  | 液体 10mL×1 瓶                 | 4℃保存   |                                                  |
| 试剂五  | A:粉体 mg×1 瓶<br>B:液体 6mL×1 瓶 | 4℃保存   | 临用前在试剂 A 中加 5.8mL 的 B 液, 再加 74.2mL 的蒸馏水, 混匀溶解备用。 |
| 标准品  | 粉体 mg×1 支                   | 4℃保存   | 若重新做标曲, 则用到该试剂                                   |

【注】: 全程需无磷环境; 试剂配置最好用新枪头和玻璃移液器等, 也可用一次性塑料器皿, 避免磷污染。

### 三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL玻璃比色皿(光径1cm)、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

### 四、 $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶 ( $\gamma$ -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(水分充足的样本可取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。4℃×12000rpm 离心 10min, 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 的比例进行提取。

- ② 细菌/细胞样本: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞(冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【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 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 700nm, 蒸馏水调零。
- ② 所有试剂解冻至室温(25℃), 在 EP 中依次加入:

| 试剂名称 ( $\mu$ L) | 测定管 | 对照管 |
|-----------------|-----|-----|
| 试剂一             | 100 | 100 |
| 试剂二             | 20  | 20  |

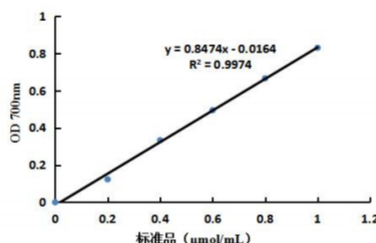
|                              |     |     |
|------------------------------|-----|-----|
| 样本                           | 40  |     |
| 试剂三                          | 40  | 40  |
| 混匀后立即 37°C准确孵育 30min。        |     |     |
| 试剂四                          | 100 | 100 |
| 样本                           |     | 40  |
| 混匀，12000rpm，4°C离心 5min，上清液待测 |     |     |

③ 显色反应，在 1mL 玻璃比色皿中加入：

|                                                                                        |     |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 上清液                                                                                    | 150 | 150 |
| 试剂五                                                                                    | 600 | 600 |
| 混匀，室温静置 3min，700nm 下读取各管吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本做一个自身对照）。 |     |     |

## 五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.8474x - 0.0164$ ，x 是标准品摩尔浓度（ $\mu\text{mol/mL}$ ），y 是  $\Delta A$ 。



2、按蛋白浓度计算：

定义：每小时每毫克组织蛋白催化产生  $1\mu\text{mol}$  无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\gamma\text{-GCS 酶活力}(\mu\text{mol/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0164) \div 0.8474 \times V2] \div (V1 \times Cpr) \div T \\ = 17.7 \times (\Delta A + 0.0164) \div Cpr$$

3、按样本鲜重计算：

定义：每小时每克组织催化产生  $1\mu\text{mol}$  无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\gamma\text{-GCS 酶活力}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0164) \div 0.8474 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ = 17.7 \times (\Delta A + 0.0164) \div W$$

4、按细菌或细胞密度计算：

定义：每小时每 1 万个细菌或细胞催化产生  $1\mu\text{mol}$  无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\gamma\text{-GCS 酶活力}(\mu\text{mol/h} / 10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0164) \div 0.8474 \times V2] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ = 0.0354 \times (\Delta A + 0.0164)$$

5、液体中  $\gamma\text{-GCS}$  活力计算：

定义：每小时每毫升液体催化产生  $1\mu\text{mol}$  无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\gamma\text{-GCS 酶活力}(\mu\text{mol/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0164) \div 0.8474 \times V2] \div V1 \div T = 17.7 \times (\Delta A + 0.0164)$$

V---提取液体积，1mL；

V1---样本体积，0.04mL；

V2---酶促反应总体积，0.3mL；

T---反应时间，1/2 小时；

W---样本鲜重，g；

500---细菌或细胞总数，500 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。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（ $5\mu\text{mol/mL}$ ）：标准品用 10mL 试剂一溶解。（母液需在两天内用）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.  $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据显色反应阶段测定管的加样体系操作，根据结果即可制作标准曲线。