

## γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶 (γ-GCS) 活性测定试剂盒

(货号: G0214W 微板法 96 样)

### 一、产品简介:

γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ-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γ-谷氨酸半胱氨酸(γ-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, γ-GCS 催化谷氨酸和半胱氨酸合成γ-谷氨酰半胱氨酸(γ-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γ-GCS 活性。

### 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 120mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 40mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉体 mg×1 支	-20°C保存	临用前甩几下使粉末全部落入底部, 加入 4.4mL 的试剂一, 混匀溶解备用。
试剂三	粉体 mg×1 瓶	4°C保存	临用前甩几下使粉末全部落入瓶底, 加入 8.8mL 的试剂一, 混匀溶解备用。
试剂四	液体 20mL×1 瓶	4°C保存	
试剂五	A:粉体 mg×1 瓶 B:液体 4mL×1 瓶	4°C保存	临用前在试剂 A 中加 3.6mL 的 B 液, 再加 46.4mL 的蒸馏水, 混匀溶解备用。
标准品	粉体 mg×1 支	4°C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:

酶标仪、96 孔板、离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

### 四、γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶 (γ-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。4°C×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°C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<sup>4</sup>): 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 30 min 以上, 调节波长到 700nm, 所有试剂解冻至室温 (25°C)。
- ② 依次在 EP 管孔板中加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
试剂一	100	100
试剂二	20	20
样本	40	

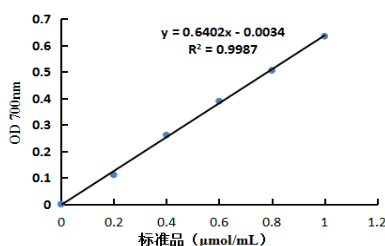
试剂三	40	40
混匀后立即 37°C 准确孵育 30min。		
试剂四	100	100
样本		40
混匀，12000rpm，4°C 离心 5min，上清液待测		

③ 显色反应，在 96 板中加入：

上清液	50	50
试剂五	200	200
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： $y = 0.6402x - 0.0034$ ， $x$  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。

$$\gamma\text{-GCS 酶活力}(\mu\text{mol/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0034) \div 0.6402 \times V2] \div (V1 \times Cpr) \div T$$

$$= 23.43 \times (\Delta A + 0.0034) \div Cpr$$

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。

$$\gamma\text{-GCS 酶活力}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0034) \div 0.6402 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T$$

$$= 23.43 \times (\Delta A + 0.0034) \div W$$

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。

$$\gamma\text{-GCS 酶活力}(\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0034) \div 0.6402 \times V2] \div (500 \times V1 \div V) \div T$$

$$= 0.047 \times (\Delta A + 0.0034)$$

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。

$$\gamma\text{-GCS 酶活力}(\mu\text{mol/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0034) \div 0.6402 \times V2] \div V1 \div T = 23.43 \times (\Delta A + 0.0034)$$

$V$ ---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.  $\mu\text{mol/mL}$ 。
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。