

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-谷氨酰半胱氨酸(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(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、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	

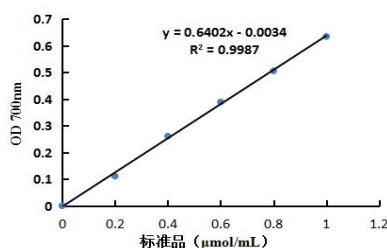
试剂三	40	40
混匀后立即 37°C准确孵育 30min。		
试剂四	100	100
样本		40
混匀, 12000rpm, 4°C离心 5min, 上清液待测		

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, $\Delta A = A_{测定} - A_{对照}$ (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 是标准品摩尔质量 ($\mu\text{mol/mL}$), y 是 ΔA 。



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。

$$\begin{aligned} \gamma\text{-GCS 酶活力}(\mu\text{mol/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0034) \div 0.6402 \times V2] \div (V1 \times Cpr) \div T \\ &= 23.43 \times (\Delta A + 0.0034) \div Cpr \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \gamma\text{-GCS 酶活力}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0034) \div 0.6402 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 23.43 \times (\Delta A + 0.0034) \div W \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \gamma\text{-GCS 酶活力}(\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0034) \div 0.6402 \times V2] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 0.047 \times (\Delta A + 0.0034) \end{aligned}$$

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. $\mu\text{mol/mL}$ 。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。