

γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶 (γ-GCS) 活性测定试剂盒

货号: BN72136 | 方法: 微板法 | 规格: 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℃保存	
试剂一	液体 40mL×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 4.4mL 的试剂一, 混匀溶解备用。
试剂三	粉体 mg×1 瓶	4℃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℃保存	
试剂五	A:粉体 mg×1 瓶 B:液体 4mL×1 瓶	4℃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℃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℃×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 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℃)。

- 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

本产品仅用于科研

TEL: 010-82422342 www.biorigin.Ltd

试剂二	20	20
样本	40	
试剂三	40	40
混匀后立即 37℃准确孵育 30min。		
试剂四	100	100
样本		40
混匀，12000rpm，4℃离心 5min，上清液待测		

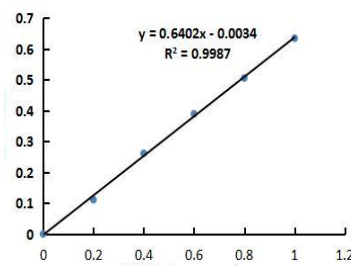
③ 显色反应，在 96 板中加入：

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）。		

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；
针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

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 ΔA 。



标准曲线示意图

说明：标准曲线由标准品测定获得，具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

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 γ -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。