

γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶（γ-GCS）活性测定试剂盒

（货号：ADS-W-G008 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂一	液体 40mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉体 mg×1 瓶	-20℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 4.4mL 的试剂一，混匀溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	粉体 mg×1 瓶	4℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 8.8mL 的试剂一，混匀溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	A:粉体 mg×1 瓶 B:液体 6mL×1 瓶	4℃避光保存	1. 临用前在试剂 A 中加 5.7mL 的 B 液，再加 44.3mL 的蒸馏水，混匀溶解备用； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	粉体 mg×1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

【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、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

- 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（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、检测步骤：

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：

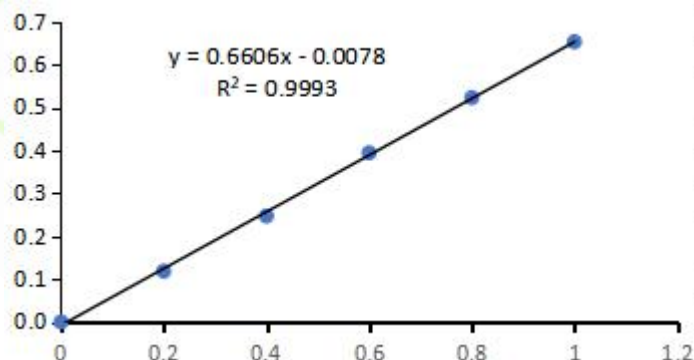
试剂组分（μL）	测定管	对照管
试剂一	100	100
试剂二	20	20
样本	40	
试剂三	40	40
混匀后立即 37℃准确孵育 30min。		
试剂四	100	100
样本		40
混匀，12000rpm，4℃离心 5min，上清液待测		

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）。		

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.6606x - 0.0078$ ，x 是标准品摩尔质量（μmol/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 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \gamma\text{-GCS 酶活力}(\mu\text{mol/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0078) \div 0.6606 \times V_2] \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 22.7 \times (\Delta A + 0.0078) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算：

定义：每小时每克组织催化产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \gamma\text{-GCS 酶活力}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0078) \div 0.6606 \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) \div T \\ &= 22.7 \times (\Delta A + 0.0078) \div W \end{aligned}$$

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 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\gamma\text{-GCS 酶活力}(\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0078) \div 0.6606 \times V_2] \div (500 \times V_1 \div V) \div T$$

$$=0.045 \times (\Delta A + 0.0078)$$

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。

$$\gamma\text{-GCS 酶活力 } (\mu\text{mol/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0078) \div 0.6606 \times V_2] \div V_1 \div T = 22.7 \times (\Delta A + 0.0078)$$

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。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 标准品用 10mL 试剂一溶解, (母液需在两天内用), 标准品母液浓度为 $5\mu\text{mol/mL}$ 。将母液用试剂一稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, $1\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本调整标准品浓度。

- 2 标品稀释参照表如下:

吸取标准品母液 200uL, 加入 800uL 蒸馏水, 混匀得到 $1\mu\text{mol/mL}$ 的标品稀释液待用。						
标品浓度 $\mu\text{mol/mL}$	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据显色反应阶段测定管的加样表操作, 根据结果, 以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值, 过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	50	
蒸馏水		50
试剂五	200	200
混匀, 室温静置 3min, 700nm 下读取各管吸光值, $\Delta A = A_{\text{测定}} - 0 \text{ 浓度管}$ 。		