



## $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶 ( $\gamma$ -GCS) / $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸连接酶 (GCL) 活性试剂盒

可见分光光度法

货号: R43861-48S

### 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。

### 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。

### 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。

### $\gamma$ -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。 $4^{\circ}\text{C}$   $\times$  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  $4^{\circ}\text{C}$  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( $10^4$ ): 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( $25^{\circ}\text{C}$ ),在EP 中依次加入:

| 试剂名称( $\mu\text{L}$ )                 | 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 $37^{\circ}\text{C}$ 准确孵育30min。 |     |     |
| 试剂四                                   | 100 | 100 |
| 样本                                    |     | 40  |



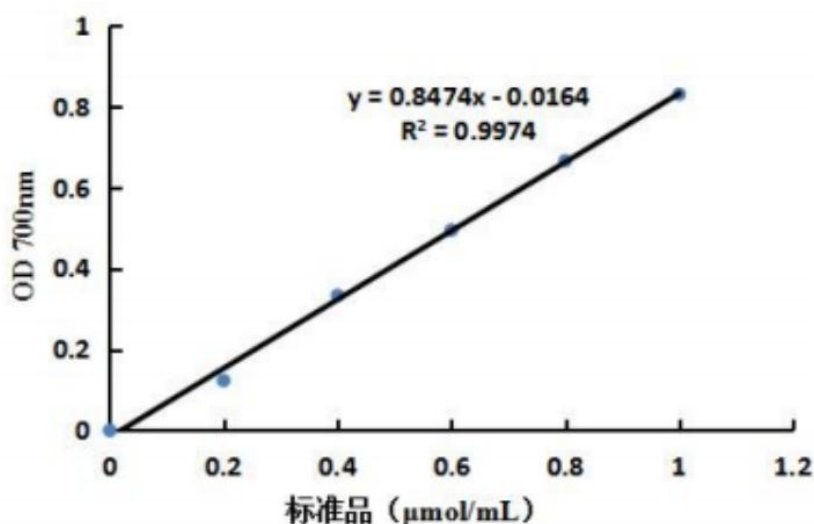
混匀, 12000rpm, 4℃离心5min, 上清液待测

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)。 |     |     |

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 $\mu$ 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 $\gamma$ -GCS 活力计算:

定义: 每小时每毫升液体催化产生1 $\mu$ 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;

50---细菌或细胞总数, 500万;

Cp---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 $\mu$ 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.  $\mu$ 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。



上海源叶生物科技有限公司  
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd  
电话: 400-666-5481 传真: 021-55068248  
网址: [www.shyuanye.com](http://www.shyuanye.com)  
邮箱: 3008007435@qq.com

---



源叶