



γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶测试盒说明书(精简版)

(货号: A091-2 γ-GCS 紫外比色速率法 20T/18样)

一、测定意义:

谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ -glutamylcysteine synthetase, γ -GCS), 是谷胱甘肽(GSH)合成过程中的限速酶。细胞内 γ -GCS活性升高使GSH合成加速, 从而提高细胞内外GSH的浓度。GSH是机体一种重要的抗氧化剂, 在保持气道上皮细胞完整性、抵御肺部损伤与炎症和抗氧化损伤等方面起到重要的作用, 肺脏具有较高浓度的 γ -GCS酶活及GSH浓度(6.1~17.5nmol/mg肺组织), 呼吸道上皮内衬液中GSH的浓度(200~400 μ mol/l)是血浆中的100倍。所以GSH在呼吸道炎症及过敏反应中起了非常重要的作用, 并且对心血管疾病及肿瘤的治疗、预后有很大研究价值。

二、测定原理:

谷氨酸和半胱氨酸在谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ -GCS)及NADPH的催化作用下, 消耗ATP, 生成 γ -谷氨酰半胱氨酸、无机磷和ADP, 在340nm下, 由NADH的吸光度下降曲线与 γ -GCS的含量成正比关系, 从而计算出谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ -GCS)的活性。

三、试剂组成及配制: (试剂盒有效期6个月)

编号	试剂内容	剂型	装量	配制
试剂一	基质液 1#	液体	8mL x 1 瓶	-
	基质液 2#	粉剂	5 支	每支加基质稀释液 0.1mL 溶解
	基质液 3#	粉剂	5 支	每支加基质稀释液 0.1mL 溶解
	基质液 4#	粉剂	1 支	每支加基质稀释液 0.1mL 溶解
	基质液 5#	粉剂	1 支	每支加基质稀释液 0.033mL 溶解
	基质液 6#	液体	50 μ L x 1 支	-
	基质稀释液	液体	1.2ml x 1 瓶	-
基质应用液的配制: 按基质液 1#:2#:3#:4#:5#:6#=400 μ L:25 μ L:25 μ L:5 μ L: 1.5 μ L:2.5 μ L, 用多少配多少, 现用现配。				
试剂二	激活剂	粉剂	1 支	用时每支加双蒸水 0.42 mL

四、所需仪器及试剂:

可调340nm波长的紫外分光光度计及1cm光径(2mm内径)狭缝石英比色皿, 秒表, 37 $^{\circ}$ C水浴锅, 涡旋混匀器, 蒸馏水, 蛋白测定试剂(本公司有售)。

五、操作步骤:

加入物	测定管
基质液应用液 (μ l)	460
37 $^{\circ}$ C水浴3min	
激活剂 (μ l)	10
样 本 (μ l)	25
加样的同时开始计时, 快速混匀后, 340nm, 1cm光径2mm内径狭缝比色皿蒸馏水调零, 读取30秒时的初始吸光度A1值, 比色皿不取出, 37 $^{\circ}$ C读取2分30秒的吸光度A2值	

六、计算公式:

1、单位定义: 在37 $^{\circ}$ C反应条件下, 每克组织蛋白在本反应体系中每分钟消耗1 μ mol的NADPH定义为1个酶活力单位。

2、计算公式:

$$\begin{aligned} \gamma\text{-GCS活力} &= \frac{A_1 - A_2}{\text{毫摩尔消光系数}} \times \frac{1}{\text{反应时间} \times \text{比色光径}} \times \frac{\text{反应液总体积}}{\text{取样量}} \times \frac{\text{待测样本蛋白浓度}}{\text{(gprot/ml)}} \\ &= \frac{A_1 - A_2}{6.22} \times \frac{1}{2 \times 1} \times \frac{0.495}{0.025} \times \frac{\text{待测样本蛋白浓度}}{\text{(gprot/ml)}} \end{aligned}$$