



γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶测试盒说明书(精简版)

(货号: A091-1-1 γ-GCS 微量定磷法 100管/48样)

一、测定意义:

谷氨酰半胱氨酸合成酶(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(200~400μmol/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、予后有很大研究价值。

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)的催化作用下,消耗ATP,反应生成γ-谷氨酰半胱氨酸、无机磷和ADP,在636nm下,通过显色反应测定体系中无机磷的量可判断谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ-GCS)的活力的高低。

三、所需仪器及试剂:

可调636nm波长的可见光分光光度计及1cm光径比色皿(或酶标仪及96孔板),涡旋混匀器,离心机,37℃水浴锅,秒表,双蒸水,生理盐水,蛋白测定试剂(本公司有售)。

四、试剂组成及配制:(试剂盒有效期6个月)

	组份	规格	保存
试剂一	缓冲液	25mL×1瓶	4℃保存
试剂二	基质液	25mL×1瓶	4℃保存
试剂三	促进剂	粉剂×3支	4℃保存
		溶剂10mL×1瓶	4℃保存
试剂三应用液的配制:临用前每支试剂三粉剂加试剂三溶剂1.8mL溶解,现配现用。			
试剂四	终止剂	6mL×1瓶	室温保存
试剂五	显色剂	甲液7mL×8瓶	4℃保存
		乙液6mL×8瓶	4℃保存
试剂五显色剂的配制:按试剂五甲液:按试剂五乙液=7:6的比例配制,4℃保存,防止磷污染。(注:试剂五乙液在低温时可能会有絮状沉淀,此时可以将其60℃加热10分钟左右溶解后再使用)			
试剂六	稳定剂	100mL×1瓶	室温保存
试剂七	10mmol/L标准磷贮备液	5mL×1瓶	4℃避光保存
基质液缓冲液配制:按试剂一:试剂二=0.25:0.25的比例配制,需多少配多少,现用现配,混合试剂在1~2小时内稳定。			
显色剂的配制:用时取一瓶试剂五甲液加入一瓶试剂五乙液中,充分混匀,4℃保存,配好的显色剂的量够做13个管子(如果你的样本量很少,可以按试剂五甲液:乙液=7:6的比例自行配制显色剂,需多少配多少),配好的显色剂4℃条件下至少可保存五天。			
0.1μmol/mL标准磷应用液配制:用时将10mmol/L标准磷贮备液用双蒸水100倍稀释,即取10mmol/L的贮备液0.1mL加双蒸水至10mL。			
0.02μmol/mL磷标准液配制:用时将0.1μmol/mL磷标准液用双蒸水5倍稀释,即取0.1μmol/mL磷标准液1mL加双蒸水4mL。			

五、操作步骤:

1、样本的前处理:

组织的前处理:准确称取组织重量,按重量(g):体积(mL)=1:9的比例,加入9倍体积的生理盐水,冰水浴条件下机械匀浆,2500转/分,离心10分钟,取上清液(即10%的匀浆上清液),再用生理盐水10倍稀释成1%,同时用考马斯亮蓝试剂测定组织蛋白(试剂本所有售)。如果预试结果太高,再将1%的组织匀浆稀释成不同浓度再进行预试后再决定取样浓度。

培养细胞的前处理:将培养细胞消化,离心,弃上清,留下层细胞,每管加0.2~0.3mL生理盐水或匀浆介质制备成10⁷/cm³细胞悬液,即10⁷/mL,再进行破碎。破碎细胞的方法有三种:①、用匀浆器匀浆。②、用超声粉碎机粉碎。③、反复冻溶3次(第③种方法有时会影响酶活力)。

制备好的细胞悬液不需要离心,同时用考马斯亮蓝试剂测定组织蛋白(试剂本所有售)。再将细胞匀浆液稀释成不同浓度进行预试,根据预试结果决定取样浓度。

[注1]:在测试加样前要摇匀后取样。

[注2]:不可用磷酸盐缓冲液或含磷的试剂作为样本匀浆或稀释样本。

[注3]:预试结果将绝对吸光度值(测定管吸光度值—对照管吸光度值)控制在0.2左右为宜。

2、操作表:

	空白管	标准管	测定管	对照管
基质缓冲液(μL)			250	250
促进剂(μL)			25	25
样本(μL)			25	
37℃水浴6min				
终止剂(μL)			25	25
样本(μL)				25
双蒸水	325			
0.02μmol/mL磷标准液(μL)		325		
显色剂(μL)	1000	1000	1000	1000
充分混匀,室温静置2min				
稳定剂(μL)	1000	1000	1000	1000
充分混匀,37℃静置10min后,636nm,1cm光径双蒸水调零比色				

六、计算:

1、单位定义:规定每小时每毫克组织蛋白的组织中ATP酶分解ATP产生1μmol无机磷的量为一个ATP酶活力单位。即微摩尔磷/毫克蛋白/小时(μmolPi/mgprot/hour)。

2、计算公式:

$$\gamma\text{-GCS活力} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times \frac{60}{T} \times 13 \div C_{\text{pr}} \text{ (U/mgprot)}$$

C_{标准}:磷标准液浓度,0.02μmol/mL;

T:反应时间,6分钟;

C_{pr}:样本蛋白浓度,mgprot/mL(prot指蛋白)。

附录 I: 磷标准曲线的制备

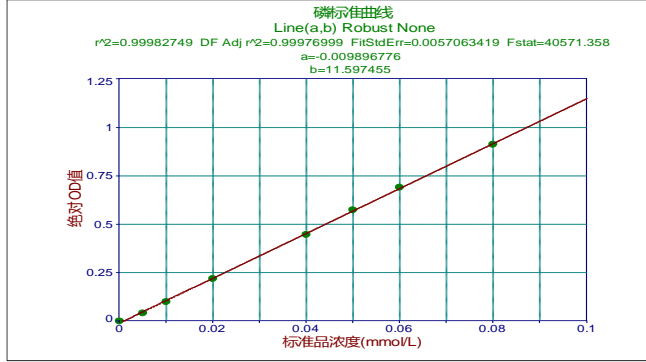
1、前处理:

将10mmol/L的磷标准液用双蒸水稀释成不同的浓度:0.005、0.01、0.02、0.04、0.05、0.06、0.08、0.1mmol/L。

2、操作表:

	空白管	标准管
双蒸水	325	
0.02μmol/mL磷标准液(μL)		325
显色剂(μL)	1000	1000
充分混匀,室温静置2min		
稳定剂(μL)	1000	1000
充分混匀,室温静置5min后,636nm,1cm光径双蒸水调零比色		

3、绘图如下:(以磷标准浓度为横坐标,绝对吸光度为纵坐标,作磷标准曲线图如下)



注：标准曲线用户无须制作，按计算公式计算即可，不影响结果。