

γ -谷氨酰半胱氨酸连接酶（GCL）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：AC10265

规格：100T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 55 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂三	粉剂×1 瓶	4°C保存
试剂四	液体 7 mL×1 瓶	4°C保存
试剂五	粉剂×1 瓶	4°C保存
标准品	液体 1 mL×1 支	4°C保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加 6 mL 蒸馏水充分震荡溶解，用不完的试剂-20°C分装保存，禁止反复冻融；
- 2、试剂三：临用前加 5 mL 蒸馏水充分震荡溶解；
- 3、试剂五：临用前加入 12 mL 蒸馏水，充分震荡溶解后，缓缓加入 400 μ L 浓硫酸（自备），边加边搅拌；
- 4、标准品：1 μ mol/mL磷标准溶液。临用前将标准液用蒸馏水稀释成0.1 μ mol/mL磷标准溶液。

产品说明：

GCL（glutamate cysteine ligase）是GSH合成的限速酶，GSH对GCL有反馈抑制作用。GCL基因表达受多种因素调节，如氧化剂、抗氧化剂、生长因子和炎症因子等。GCL活性高低对GSH含量和GSH/GSSG比值有重要影响。

在ATP和Mg²⁺存在下，GCL催化谷氨酸和半胱氨酸合成 γ -谷氨酰半胱氨酸 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GCL活性。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

冷冻离心机、水浴锅、移液器、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96孔板、研钵/匀浆器、浓硫酸和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 组织：按照组织质量（g）：试剂一体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一）进行冰浴匀浆。8000g，4°C离心 10min，取上清，置冰上待测。
2. 细菌、细胞 按照细胞数量（10⁴个）：试剂一体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）然后 8000g，4°C，离心 10min，取上清置于冰上待测。
3. 血清等液体：直接测定。

二、测定步骤

1、分光光度计或酶标仪预热30min，调节波长到660nm，蒸馏水调零。

2、加样表：

试剂	对照管	测定管	标准管	空白管
试剂一 (μL)	48	48		
试剂二 (μL)	52	52		
试剂三 (μL)	12	12		
样本 (μL)	-	24		
混匀后盖紧，37°C水浴准确反应15min；				
试剂四 (μL)	60	60		
样本 (μL)	24	-		
混匀后，室温（25°C左右）10000rpm，离心10 min；				
上清 (μL)	100	100	-	-
磷标准品 (μL)	-	-	100	-
蒸馏水 (μL)	-	-	-	100
试剂五 (μL)	100	100	100	100
混匀后盖紧，45°C水浴 10min，冷却后测定 660nm 处光吸收，尽快测完。计算 $\Delta A_{测} = A_{测定管} - A_{对照管}$ ， $\Delta A_{标} = A_{标准管} - A_{空白管}$ 。				

三、GCL活性计算

(1) 按蛋白浓度计算

活性单位定义：37°C下，每毫克蛋白每分钟催化产生1μmol无机磷的GCL酶活量为1个酶活力单位。

$$GCL (U/mg \text{ prot}) = [\Delta A_{测} \div (\Delta A_{标} \div C_{标准液}) \times V_{反总}] \div (C_{pr} \times V_{样}) \div T = 0.0544 \times \Delta A_{测} \div \Delta A_{标} \div C_{pr}$$

(2) 按样本质量计算

活性单位定义：37°C下，每克样本每分钟催化产生1μmol无机磷的GCL酶活量为1个酶活力单位。

$$GCL (U/g \text{ 质量}) = [\Delta A_{测} \div (\Delta A_{标} \div C_{标准液}) \times V_{反总}] \div (W \div V_{样总} \times V_{样}) \div T = 0.0544 \times \Delta A_{测} \div \Delta A_{标} \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：37°C下，每10⁴个细胞每分钟催化产生1μmol无机磷的GCL酶活量为1个酶活单位。

$$GCL (U/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A_{测} \div (\Delta A_{标} \div C_{标准液}) \times V_{反总}] \div (\text{细胞数量} \times V_{样} \div V_{样总}) \div T \\ = 0.0544 \times \Delta A_{测} \div \Delta A_{标} \div \text{细胞数量}$$

(4) 按照液体体积计算

活性单位定义：37°C下，每mL液体每分钟催化产生1μmol无机磷的GCL酶活量为1个酶活单位。

$$GCL (U/mL) = [\Delta A_{测} \div (\Delta A_{标} \div C_{标准液}) \times V_{反总}] \div V_{样} \div T = 0.0544 \times \Delta A_{测} \div \Delta A_{标}$$

V反总：反应总体积，0.196mL；V样：加入样本体积，0.024 mL；Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL；T：反应时间，15min；C标准液：磷标准溶液浓度，0.1μmol/mL；V样总：加入试剂一的体积，1mL；W：样本质量，g；细胞数量：以10⁴为单位计算，万个。

注意事项:

- 1、样本处理等过程均需要在冰上进行，且须在当日测定酶活力，以免影响其活力。如果是匀浆液，避免反复冻融。
- 2、样本测定前先取 1-2 个样做预实验，如吸光值大于 1，应先用试剂一(或者生理盐水)稀释到适当倍数，哺乳动物组织和血液一般稀释 3-5 倍。
- 3、细胞中 GCL 活性测定时，细胞数目须在 300 万-500 万之间，细胞中 GCL 的提取时可加试剂一（或生理盐水）后研磨或超声波处理，不能用细胞裂解液处理细胞。
- 4、试剂三配制完成后，请一周内使用完。
- 5、试剂五配制过程中，可能会产生黑色固体，其不影响结果，注意吸取时不要将黑色固体吸入。该溶液配制完成后应为浅黄色，若为蓝色则已污染，不可再使用。
- 6、测定吸光值时请于水浴后 10-40 分钟内测完。

实验实例:

- 1、取 0.1g 三叶草加入 1mL 试剂一进行冰浴匀浆。8000g, 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算 $\Delta A_{\text{测}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 0.784 - 0.415 = 0.369$, $\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}} = 0.371 - 0.042 = 0.329$, 按样本质量计算酶活得:
$$\text{GCL (U/g 质量)} = 0.0544 \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \div W = 0.61 \text{ U/g 质量。}$$
- 2、取 0.1g 柳树加入 1mL 试剂一进行冰浴匀浆。8000g, 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算 $\Delta A_{\text{测}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 0.530 - 0.366 = 0.164$, $\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}} = 0.371 - 0.042 = 0.329$, 按样本质量计算酶活得:
$$\text{GCL (U/g 质量)} = 0.0544 \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \div W = 0.271 \text{ U/g 质量。}$$