

# γ-谷氨酰半胱氨酸连接酶 (GCL) 活性测定试剂盒说明书(精简版)

(货号: A120-1-1 Glutamate Cysteine Ligase, 分光光度法 50T/24样)

## 一、测定意义

GCL是还原型谷胱甘肽(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含量和还原型和氧化型谷胱甘肽(GSH/GSSG)比值有重要影响。

## 二、测定原理

在ATP和Mg<sup>2+</sup>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分解产生无机磷,通过测定无机磷增加速率,即可计算出GCL活性。

## 三、自备仪器用品

低温离心机、可见分光光度计、水浴锅、1mL玻璃比色皿、浓硫酸、蒸馏水

## 四、试剂组成和配制

- 试剂一 液体×1 瓶,4℃保存;  
 试剂二 粉剂×1 瓶,4℃保存,临用前加14mL蒸馏水充分震荡溶解;  
 试剂三 粉剂×1 瓶,4℃保存,临用前加3.5mL蒸馏水充分震荡溶解;  
 试剂四 液体×1 瓶,室温保存;  
 试剂五 粉剂×1 瓶,4℃保存,临用前加30mL蒸馏水充分震荡溶解,缓缓加入1.0mL浓硫酸,边加边搅拌。

## 五、样品前处理

- 1.组织:按照组织质量(g):试剂一体积(mL)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。10000rpm,4℃离心10min,取上清置冰上待测。
- 2.细菌、真菌:按照细胞数量(10<sup>4</sup>个):试剂一体积(mL)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(功率300W,超声3s,间隔7秒,总时间3min);在4℃下10000rpm离心10min,取上清,置冰上待测。
- 3.血清浆等液体:直接取样

## 六、GCL测定步骤

- 1.分光光度计预热30min以上,调节波长到660nm,用蒸馏水调零;
- 2.操作步骤:

	测定管	对照管
待测样本(μL)	120	
试剂一(μL)	240	240
试剂二(μL)	260	260
试剂三(μL)	60	60
混匀,37℃准确水浴15分钟		
试剂四(μL)	300	300
待测样本(μL)		120
混匀,室温(25℃)下10000rpm离心10分钟,取上清500μL待测		
上清(μL)	500	500
试剂五(μL)	500	500
混匀后盖紧,45℃水浴10分钟,冷却后,空白管调零(或蒸馏水调零),测定660nm处各管吸光度值,计算ΔA=A <sub>测定管</sub> -A <sub>对照管</sub> 。		

注:吸光度需在水浴完成后尽快测定完成。

## 七、GCL活性计算

### (1) 按样本蛋白浓度计算

活性单位定义:在37℃,每毫克蛋白每分钟催化产生1μg无机磷的GCL酶活量为1U。

$$\begin{aligned} \text{GCL活性} &= \Delta A \div 0.1427 \times \frac{V_{\text{反应总}}}{\text{Cpr} \times V_{\text{样}}} \div T \\ (\text{U/mgprot}) &= 3.815 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

### (2) 按样本质量计算

活性单位定义:在37℃,每克样品每分钟催化产生1μg无机磷的GCL酶活量为1U。

$$\begin{aligned} \text{GCL活性} &= \Delta A \div 0.1427 \times \frac{V_{\text{反应总}}}{W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}} \div T \\ (\text{U/g鲜重}) &= 3.815 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

### (3) 按细胞数量计算

活性单位定义:在37℃,每10<sup>4</sup>个细胞每分钟催化产生1μg无机磷的GCL酶活量为1U。

$$\begin{aligned} \text{GCL活性} &= \Delta A \div 0.1427 \times \frac{V_{\text{反应总}}}{\text{细胞数} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}} \div T \\ (\text{U}/10^4 \text{ cells}) &= 3.815 \times \Delta A \div \text{细胞数} \end{aligned}$$

### (4) 按样本体积计算

$$\begin{aligned} \text{GCL活性} &= \Delta A \div 0.1427 \times \frac{V_{\text{反应总}}}{V_{\text{样}}} \div T \\ (\text{U/mL}) &= 3.815 \times \Delta A \end{aligned}$$

0.1427:回归方程系数;

V<sub>反应总</sub>:反应体系总体(L),980μL=0.98×10<sup>-3</sup>L;

Cpr:上清液蛋白质浓度(mg/mL),需要另外测定,建议使用本公司BCA(A045-3/A045-4)或考马斯亮蓝法(A045-2)蛋白质含量测定试剂盒;

V<sub>样</sub>:加入反应体系中上清液体积(mL),120μL=0.12mL;

V<sub>样总</sub>:加入提取液体积,1mL;

T:催化反应时间(min),15min;

W:样本质量,(g);

细胞数量:(10<sup>4</sup>)个。

## 八、注意事项

- 1.样品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.所有粉剂溶液配置完后,除特定说明,请在当日用完;
- 3.实验过程中请带手套,试剂三中含有强腐蚀性物质,注意不要溅到皮肤上或眼睛内;
- 4.吸光度测定请于水浴后10-40分钟内完成;
- 5.样品测定请先取1-2个样品做预试验,如发现吸光率太高,应先用试剂一(或生理盐水)稀释适当倍数,哺乳动物组织一般稀释3-5倍;
- 6.试剂三配置过程中,可能会产生黑色固体,注意吸取时不要讲黑色固体吸入,则其不会影响结果;
- 7.细胞中GCL活性测定时,细胞数量需在300万-500万之间,细胞中GCL的提取时可加入试剂一(或生理盐水)后研磨或超声处理,不能用细胞裂解液处理细胞。