

## γ-谷氨酰半胱氨酸连接酶(GCL)活性检测试剂盒 γ-glutamylcysteine ligase Assay Kit

微量法

货号: AK047

规格: 100T / 96S

产品组成及保存条件:

	规格	储存条件
AK047-A	100mL×1 瓶	4℃保存;
AK047-B	粉剂×1 瓶	4℃保存; 临用前加 6 mL 蒸馏水充分震荡溶解。
AK047-C	粉剂×1 瓶	4℃保存; 临用前加入蒸馏水 1.5 mL 充分震荡溶解。
AK047-D	7mL×1 瓶	室温保存;
AK047-E	粉剂×1 瓶	4℃保存; 临用前加入 12 mL 蒸馏水, 充分震荡溶解后, 缓缓加入 400μL 浓硫酸(自备), 边加边搅拌。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: γ-谷氨酰半胱氨酸连接酶(γ-glutamylcysteine ligase, GCL) 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。

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 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。

自备用品:

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

粗酶液提取:

1. 组织: 按照组织质量 (g): AK047-A 体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK047-A) 进行冰浴匀浆。8000g, 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): AK047-A 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL AK047-A), 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℃, 离心 10min, 取上清置于冰上待测。
3. 血清等液体: 直接测定。

测定步骤:

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min, 调节波长到 660nm, 蒸馏水调零。
2. 取 1.5mLEp 管, 依次加入下列试剂

试剂名称	空白管 (ul)	测定管 (ul)
AK047-A	72	48
AK047-B	52	52
AK047-C	12	12
样本上清液		42
混匀后盖紧, 37℃水浴准确反应 15min;		
AK047-D	60	30
混匀后, 室温 (25℃左右) 8000g, 离心 10 min, 取上清 100μL, 加入新管		

取上清	100	100
AK047-E	100	100
混匀后盖紧，45℃水浴 10min，冷却后测定 660nm 处光吸收，记为 A 空白管、A 测定管。		

注意：空白管只需测定一次。

### GCL 活性计算公式：

#### a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线： $y=0.1427x$ ， $R^2 = 0.9987$

##### (1) 按蛋白浓度计算

活性单位定义：37℃下，每毫克蛋白每分钟催化产生 1μg 无机磷的 GCL 酶活性为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{GCL } (\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(A \text{ 测定管}-A \text{ 空白管})\div 0.1427\times V \text{ 反总}]\div(\text{Cpr}\times V \text{ 样})\div T \\ &= 3.815\times(A \text{ 测定管}-A \text{ 空白管})\div\text{Cpr} \end{aligned}$$

##### (2) 按样本质量计算

活性单位定义：37℃下，每克组织每分钟催化产生 1μg 无机磷的 GCL 酶活性为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{GCL } (\mu\text{g}/\text{min}/\text{g}) &= [(A \text{ 测定管}-A \text{ 空白管})\div 0.1427\times V \text{ 反总}]\div(W\times V \text{ 样}\div V \text{ 样总})\div T \\ &= 3.815\times(A \text{ 测定管}-A \text{ 空白管})\div W \end{aligned}$$

##### (3) 按细胞数量计算

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

$$\begin{aligned} \text{GCL } (\mu\text{g}/\text{min} / 10^4 \text{ cell}) &= [(A \text{ 测定管}-A \text{ 空白管})\div 0.1427\times V \text{ 反总}]\div(\text{细胞数量}\times V \text{ 样}\div V \text{ 样总})\div T \\ &= 3.815\times(A \text{ 测定管}-A \text{ 空白管})\div\text{细胞数量} \end{aligned}$$

##### (4) 按照液体体积计算

活性单位定义：37℃下，每毫升液体每分钟催化产生 1μg 无机磷的 GCL 酶活性为 1 个酶活单位

$$\text{GCL } (\mu\text{g}/\text{min} / \text{mL}) = [(A \text{ 测定管}-A \text{ 空白管})\div 0.1427\times V \text{ 反总}]\div V \text{ 样}\div T = 3.815\times(A \text{ 测定管}-A \text{ 空白管})$$

**注：** 0.1427：回归方程系数；V 反总：反应总体积 (mL) 196 μL=0.196 mL；Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL；V 样：加入反应体系中上清液体积，24μL=0.024mL；V 样总：提取液体积，1 mL；W：样本质量，g；T：反应时间：15min。

#### b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下

标准曲线： $y=0.07135x$ ， $R^2 = 0.9987$

##### (1) 按蛋白浓度计算

活性单位定义：37℃下，每毫克蛋白每分钟催化产生 1μg 无机磷的 GCL 酶活性为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{GCL } (\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(A \text{ 测定管}-A \text{ 空白管})\div 0.07135\times V \text{ 反总}]\div(\text{Cpr}\times V \text{ 样})\div T \\ &= 7.63\times(A \text{ 测定管}-A \text{ 空白管})\div\text{Cpr} \end{aligned}$$

##### (2) 按样本质量计算

活性单位定义：37℃下，每克组织每分钟催化产生 1μg 无机磷的 GCL 酶活性为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{GCL } (\mu\text{g}/\text{min}/\text{g}) &= [(A \text{ 测定管}-A \text{ 空白管})\div 0.07135\times V \text{ 反总}]\div(W\times V \text{ 样}\div V \text{ 样总})\div T \\ &= 7.63\times(A \text{ 测定管}-A \text{ 空白管})\div W \end{aligned}$$

##### (3) 按细胞数量计算

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

$$\begin{aligned} \text{GCL } (\mu\text{g}/\text{min} / 10^4 \text{ cell}) &= [(A \text{ 测定管}-A \text{ 空白管})\div 0.07135\times V \text{ 反总}]\div(\text{细胞数量}\times V \text{ 样}\div V \text{ 样总})\div T \\ &= 7.63\times(A \text{ 测定管}-A \text{ 空白管})\div\text{细胞数量} \end{aligned}$$

##### (4) 按照液体体积计算

活性单位定义：37℃下，每毫升液体每分钟催化产生 1μg 无机磷的 GCL 酶活量为 1 个酶活单位。

$GCL (\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}) = [(A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div 0.07135 \times V \text{ 反总}] \div V \text{ 样} \div T = 7.63 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管})$

注：0.07135：回归方程系数；V 反总：反应总体积 (mL) 196 μL = 0.196 mL；Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL；V 样：加入反应体系中上清液体积，24μL = 0.024 mL；V 样总：提取液体积，1 mL；T：反应时间：15min。

**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. 所有试剂配制完后，除表明 4℃保存外，请于 1 天内用完。
3. 实验过程请带手套，AK047-C 中有强腐蚀性物质，注意不要溅到皮肤上或眼睛内。
4. 测定吸光值时请于水浴后 10~40 分钟内测完。
5. 样本测定前先取 1-2 个样做预实验，如吸光值太高，应先用 AK047-A (或者生理盐水)稀释到适当倍数，使得吸光值在标准曲线范围内，哺乳动物组织和血液一般稀释 3~5 倍。
6. AK047-C 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。
7. 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 AK047-A (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；