

γ -谷氨酰半胱氨酸连接酶（GCL）检测试剂盒（分光光度法）

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

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。

测定原理：

在 ATP 和 Mg^{2+} 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。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 70mL×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。临用前加入蒸馏水 3.5 mL 充分震荡溶解。

试剂四：液体 16mL×1 瓶，室温保存。

试剂五：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加入 30mL 蒸馏水，充分震荡溶解后，缓缓加入 **1.0 mL 浓硫酸**（自备），边加边搅拌。

粗酶液提取：

- 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℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。
- 细菌、真菌：**按照细胞数量（ 10^4 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℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。
- 血清等液体：**直接测定。

GCL 测定步骤：

- 分光光度计预热 30min，调节波长到 660 nm，蒸馏水调零。
- 空白管：**取 1.5mLEp 管，依次加入**试剂一 240 μ L**、试剂二 260 μ L、试剂三 60 μ L 和**蒸馏水 120 μ L**，混匀后盖紧，37℃ 水浴准确反应 15 min；再加入试剂四 300 μ L，混匀后，25℃、8000g，离心 10 min，取上清 500 μ L，加入试剂五 500 μ L，混匀后盖紧，45℃ 水浴 10min，冷却后测定 660 nm 处吸光值，记为 A 空白管。
- 测定管：**取 1.5mLEp 管，依次加入**试剂一 240 μ L**、试剂二 260 μ L、试剂三 60 μ L 和**上清液 120 μ L**，混匀后盖紧，37℃ 水浴准确反应 15 min；再加入试剂四 300 μ L，混匀后，25℃、8000g，离心 10 min，取上清 500 μ L，加入试剂五 500 μ L，混匀后盖紧，45℃ 水浴 10min，冷却后测定 660 nm 处吸光值，记为 A

测定管。

注意：空白管只需要测定一次。

GCL 活性计算公式：

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°C下，每毫克蛋白每分钟催化产生 1 μ g 无机磷的 GCL 酶活性为 1 个酶活单位。

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

(2) 按样本质量计算

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

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

(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 1 μ g 无机磷的 GCL 酶活性为 1 个酶活单位。

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

(4) 按照液体体积计算

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

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

0.1427：回归方程系数；

V 反总：反应总体积 (mL) 980 μ L=0.980mL；

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，120 μ L=0.12 mL；

V 样总：加入提取液体积，1mL；

W：样本质量，g；

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°C 保存外，请于 1 天内用完。
- (3) 实验过程请带手套，试剂三中有强腐蚀性物质，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，应先用试剂一(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) 试剂三配制过程中，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；