

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	110mL×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，剩余试剂-20℃分装保存，禁止反复冻融；
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	6mL×1 瓶	室温保存；
AK047-E	粉剂×1 瓶	4℃保存；用时加入 5mL 蒸馏水，溶解后 4℃保存一周。
AK047-F	粉剂×1 瓶	4℃保存；用时加入 5mL 蒸馏水，溶解后 4℃保存一周。
AK047-G	5mL×1 瓶	室温保存；
AK047-标准品	1mL×1 瓶	10mmol/L 标准磷贮备液，4℃保存；

标准磷应用液 (0.5 μ mol/mL) 配制：将 AK047-标准品用蒸馏水 20 倍稀释充分混匀即可。

定磷剂的配制：按 H₂O: AK047-E: F: G = 2: 1: 1: 1 的比例配制，配好的定磷剂应为浅黄色。若无色则试剂失效，若是蓝色则为磷污染，定磷剂现用现配。

注意：配试剂最好用新的烧杯、玻璃棒和玻璃移液器，也可以用一次性塑料器皿，避免磷污染。

※ 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 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。

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、冰和蒸馏水。

粗酶液提取：

- 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。
- 细菌、细胞：按照细胞数量 (10⁴ 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。
- 血清等液体：直接测定。

测定步骤：

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

试剂名称	对照管 (ul)	测定管 (ul)	标准管 (ul)	空白管 (ul)
AK047-A	72	48		
AK047-B	52	52		
AK047-C	12	12		
样本上清液		24		
混匀后盖紧, 37℃水浴准确反应 15min;				
AK047-D	60	60		
混匀后, 室温 (25℃左右) 8000g, 离心 10 min, 取上清 500μL, 加入新管				
取上清	20	20		
磷标准品			20	
蒸馏水				20
定磷试剂	200	200	200	200
混匀, 室温放置 30min, 在 660nm 处, 记录各管吸光值 A: A 空白管、A 标准管、A 对照管、A 测定管。				
注: 空白管和标准管只需测定 1-2 次。				

GCL 活性计算公式:

(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 1μmol/mL 无机磷的 GCL 酶活量为 1 个酶活单位。

GCL (U/mg prot)

$$= [C \text{ 标准管} \times V \text{ 总}] \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T$$

$$= 0.27 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div Cpr$$

(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 1μmol/mL 无机磷的 GCL 酶活量为 1 个酶活单位。

GCL (U/g)

$$= [C \text{ 标准管} \times V \text{ 总}] \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T$$

$$= 0.27 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义: 37℃下, 每 10^4 个细胞每分钟催化产生 1μmol/mL 无机磷的 GCL 酶活量为 1 个酶活单位。

GCL (U/ 10^4 cell)

$$= [C \text{ 标准管} \times V \text{ 总}] \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T$$

$$= 0.27 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})$$

(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 1 μ mol/mL 无机磷的 GCL 酶活量为 1 个酶活单位

GCL (U/mL)

$$= [C \text{ 标准管} \times V \text{ 总}] \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div V \text{ 样} \div T$$

$$= 0.27 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})$$

注: C 标准管: 标准管浓度, 0.5 μ mol/mL; V 反总: 反应总体积 (mL) 196μL=0.196mL; 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, $24\mu\text{L} = 0.024 \text{ mL}$; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; W: 样本质量, g; T: 反应时间: 15min; 细胞数量: 以 10^4 为单位计算, 万个。

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. AK047-C 配制完后请于 1 周内用完。
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, 如吸光值大于 1, 应先用 AK047-A (或生理盐水) 稀释到适当倍数, 哺乳动物组织和血液一般稀释 3~5 倍。
6. 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 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。