

γ-谷氨酰半胱氨酸连接酶 (GCL) 活性检测试剂盒 (分光光度计法)
(本试剂盒仅供科研使用)**产品包装**

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0253	γ-谷氨酰半胱氨酸连接酶 (GCL) 活性检测试剂盒	50 管/48 样

产品内容

名称	规格	储存条件
试剂一	液体 70mL × 1 瓶	4℃
试剂二	粉剂 × 1 瓶: 临用前加入 14mL 蒸馏水充分震荡溶解。	4℃
试剂三	粉剂 × 1 瓶: 临用前加入 3.5mL 蒸馏水充分震荡溶解。	4℃
试剂四	液体 16mL × 1 瓶	室温
试剂五	粉剂 × 1 瓶: 临用前加入 30mL 蒸馏水充分震荡溶解后, 缓慢加入 1mL 浓硫酸 (自备) 边加入边搅拌。	4℃

一、产品说明

γ-谷氨酰半胱氨酸连接酶 (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。

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。

二、自备材料

可见分光光度计、冷冻离心机、水浴锅、移液器、1mL 玻璃比色皿、浓硫酸、蒸馏水。

三、样品制备

- 1、组织: 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 试剂一, 冰浴匀浆后, 8000g 4℃ 离心 10min, 取上清液置于冰上待测。
- 2、细菌或培养细胞: 收集不少于 500 万个细胞, 加入 1mL 试剂一, 超声破碎(冰浴, 功率 300W, 超声 3s, 间隔 7s, 总时间 3min), 8000g 4℃ 离心 10min, 取上清液放置于 4℃ 待测。
- 3、血清或血浆: 直接检测。

四、操作步骤

正式测定前, 必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

- 1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 660nm, 蒸馏水调零。
- 2、空白管: 取 1.5mL 离心管, 依次加入试剂一 240μL、试剂二 260μL、试剂三 60μL 和蒸馏水 120μL, 混匀后盖紧, 37℃ 水浴准确反应 15 min; 再加入试剂四 300μL, 混匀后, 25℃、8000g, 离心 10 min, 取上清 500μL, 加入试剂五 500μL, 混匀后盖紧, 45℃ 水浴 10min, 冷却后测定 660nm 处吸光值, 记为 A 空白管。 (空白管只需测定一次)
- 3、测定管: 取 1.5mL 离心管, 依次加入试剂一 240μL、试剂二 260μL、试剂三 60μL 和上清液 120μL, 混匀后盖紧, 37℃ 水浴准确反应 15 min; 再加入试剂四 300μL, 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 $^{\circ}$ C 水浴 10min, 冷却后测定 660nm 处吸光值, 记为 A 测定管。

五、GCL 活性的计算

标准曲线: $y=0.1427x$, $R^2=0.9987$ 。

1、按照样本蛋白浓度计算:

单位定义: 37 $^{\circ}$ C 下, 每毫克蛋白每分钟催化产生 1 μ g 无机磷的 GCL 酶活量为 1 个酶活单位。

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

2、按照样本鲜重计算:

单位定义: 37 $^{\circ}$ C 下, 每 g 组织每分钟催化产生 1 μ g 无机磷的 GCL 酶活量为 1 个酶活单位。

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

3、按照细胞/细菌数量计算:

单位定义: 37 $^{\circ}$ C、每 10⁴ 个细胞每分钟催化产生 1 μ g 无机磷的 GCL 酶活量为 1 个酶活单位。

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

4、按照血清/血浆体积计算:

单位定义: 37 $^{\circ}$ C 下, 每毫升液体每分钟催化产生 1 μ g 无机磷的 GCL 酶活量为 1 个酶活单位。

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

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。

六、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 $^{\circ}$ 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。