

## $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸连接酶 (glutamate cysteine ligase, GCL) 说明书

分光光度法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

### 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  $\gamma$ -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。

### 组成:

产品名称	GSH015-50T/48S	Storage
试剂一: 液体	70ml	4°C
试剂二: 粉剂	1 瓶	4°C
试剂三: 粉剂	1 瓶	4°C
试剂四: 液体	16ml	室温
试剂五: 粉剂	1 瓶	4°C
说明书	一份	

试剂二: 粉剂×1 瓶, 4°C 保存。临用前加 14ml 蒸馏水充分震荡溶解。

试剂三: 粉剂×1 瓶, 4°C 保存。临用前加入蒸馏水 3.5 ml 充分震荡溶解。

试剂五: 粉剂×1 瓶, 4°C 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。

### 自备仪器和用品:

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

### 粗酶液提取:

1. 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°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
2. 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,

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



4°C, 离心 10min, 取上清置于冰上待测。

3. 血清等液体: 直接测定。

### GCL 测定操作

1. 分光光度计预热 30min, 调节波长到 660 nm, 蒸馏水调零。
2. 空白管: 取 1.5mlEp 管, 依次加入试剂一 240 μl、试剂二 260μl、试剂三 60μl 和蒸馏水 120μl, 混匀后盖紧, 37°C水浴准确反应 15 min; 再加入试剂四 300μl, 混匀后, 25°C、8000g, 离心 10 min, 取上清 500μl, 加入试剂五 500μl, 混匀后盖紧, 45°C水浴 10min, 冷却后测定 660 nm 处吸光值, 记为 A 空白管。
3. 测定管: 取 1.5mlEp 管, 依次加入试剂一 240 μl、试剂二 260μl、试剂三 60μl 和上清液 120μl, 混匀后盖紧, 37°C水浴准确反应 15 min; 再加入试剂四 300μl, 混匀后, 25°C、8000g, 离心 10 min, 取上清 500μl, 加入试剂五 500μl, 混匀后盖紧, 45°C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 1μg 无机磷的 GCL 酶活性为 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 1μg 无机磷的 GCL 酶活性为 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) 按细胞数量计算

活性单位定义: 37°C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。

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

(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 1μg 无机磷的 GCL 酶活性为 1 个酶活单位。

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

0.1427: 回归方程系数; V 反总: 反应总体积 (ml) 980μl=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, 120μl=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。

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



- 
- (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；

