

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

可见分光光度法

货号：AK046

规格：50T/ 48S

产品组成及保存条件：

	规格	储存条件
AK046-A	70mLx1 瓶	4℃保存；
AK046-B	粉剂×1 瓶	4℃保存；临用前加 14 mL 蒸馏水充分震荡溶解，用不完的试剂-20℃分装保存，禁止反复冻融；
AK046-C	粉剂×1 瓶	4℃保存；临用前加入蒸馏水 3.5 mL 充分震荡溶解；
AK046-D	16mLx1 瓶	室温保存；
AK046-E	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。

※ 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、玻璃比色皿、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)：AK046-A 体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL AK046-A）进行冰浴匀浆。8000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
2. 细菌、细胞：按照细胞数量 (10⁴ 个)：AK046-A 体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL AK046-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)
AK046-A	360	240
AK046-B	260	260
AK046-C	60	60
粗酶上清液		120
混匀后盖紧，37℃水浴准确反应 15min；		
AK046-D	300	300

混匀后，室温（25℃左右）8000g，离心 10 min；		
取上清	500	500
AK046-E	500	500
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：

(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 酶活量为 1 个酶活单位。

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

$$= 3.815 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：37℃下，每 10⁴ 个细胞每分钟催化产生 1μg 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

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

注： 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；细胞数量：以 10⁴ 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. AK046-C 配制完后请于 1 周内用完。
3. 实验过程请带手套，AK046-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 AK046-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. AK046-E 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 AK046-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。