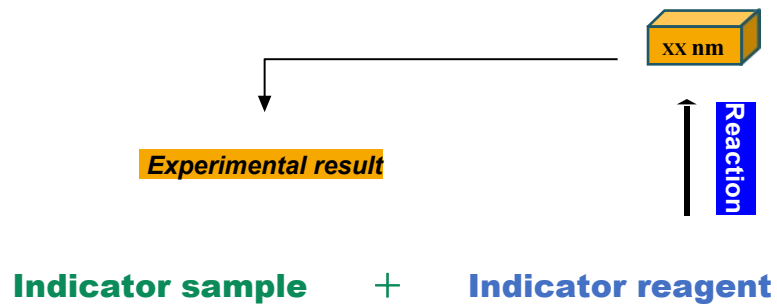


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

γ-谷氨酰半胱氨酸连接酶（GCL）试剂盒说明书

微量法

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。

自备仪器和用品：

冷冻离心机、水浴锅、移液器、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96孔板、浓硫酸和蒸馏水。

试剂组成和配制：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体×1 瓶	4℃保存	-
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加6mL蒸馏水充分震荡溶解
试剂三	粉剂×1 管	4℃保存	临用前加入蒸馏水1.5mL充分震荡溶解
试剂四	液体×1 瓶	室温保存	-
试剂五	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加入12 mL蒸馏水，充分震荡溶解后，缓缓加入400μL浓硫酸（自备），边加边搅拌

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℃离心10min，取上清，置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量（10⁴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。
3. 血清等液体：直接测定。

GCL 测定操作：

1. 分光光度计/酶标仪预热30min，调节波长到660nm，蒸馏水调零。
2. 空白管：取1.5mLEp管，依次加入试剂一72μL、试剂二52μL 和试剂三12μL，混匀后盖紧，37℃水浴准确反应15min；再加入试剂四60μL，混匀后，室温（25℃左右）8000g，离心10 min，取上清100μL，加入试剂五100μL，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。
3. 测定管：取1.5mL Ep管，依次加入试剂一48μL、试剂二52μL、试剂三12μL和上清液24μL混匀后盖紧

紧，37°C水浴准确反应15 min；再加入试剂四60μL，混匀后，室温（25°C左右）8000g，离心10min，取上清100μL，加入试剂五100μL，混匀后盖紧，45°C水浴10min，冷却后测定660nm处光吸收，记为A测定管。

注意：空白管只需测定一次。

GCL 活性计算公式：

标准曲线： $y=0.1427x$ ， $R^2=0.9987$

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(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 μg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°C下，每克组织每分钟催化产生1 μg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°C下，每 10⁴个细胞每分钟催化产生1 μg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°C下，每毫升液体每分钟催化产生1 μg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) 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, 24μL =2.4×10⁻²mL; V 样总: 提取液体积, 1mL; W: 样本质量, g;

T: 反应时间: 15min。

b. 使用96孔板测定的计算公式如下

标准曲线： $y=0.07135x$ ， $R^2=0.9987$

(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 μg无机磷的GCL酶活量为1个酶活单位。

$$\text{GCL} (\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div 0.07135 \times V \text{ 反总}] \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T \\ = 7.63 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}$$

(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1 μg无机磷的GCL酶活量为1个酶活单位。

$$\text{GCL} (\mu\text{g}/\text{min}/\text{g}) = [(A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div 0.07135 \times V \text{ 反总}] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 7.63 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：37°C下，每10⁴个细胞每分钟催化产生1 μg无机磷的GCL酶活量为1个酶活单位。

$$\text{GCL} (\mu\text{g}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div 0.07135 \times V \text{ 反总}] \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 7.63 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div \text{细胞数量}$$

(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1 μg无机磷的 GCL酶活量为1个酶活单位。

$$\text{GCL} (\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}) = [(\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div 0.07135 \times \text{V 反总}] \div \text{V 样} \div \text{T} \\ = 7.63 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管})$$

0.07135：回归方程系数；V 反总：反应总体积 (mL) 196 μL=0.196 mL；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，24μL =2.4×10⁻² mL；V 样总：提取液体积，1 mL；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；