



## γ-谷氨酰半胱氨酸连接酶（GCL）活性检测试剂盒说明书

微量法

**注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。**

货号：BC1215

规格：100T/48S

**产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。**

| 试剂名称  | 规格           | 保存条件    |
|-------|--------------|---------|
| 试剂一   | 液体 65 mL×1 瓶 | 2-8°C保存 |
| 试剂二 A | 液体 5 mL×1 瓶  | 2-8°C保存 |
| 试剂二 B | 粉剂×1 瓶       | -20°C保存 |
| 试剂三   | 粉剂×1 瓶       | 2-8°C保存 |
| 试剂四   | 液体 7 mL×1 瓶  | 2-8°C保存 |
| 试剂五   | 粉剂×1 瓶       | 2-8°C保存 |
| 试剂六   | 粉剂×1 瓶       | 2-8°C保存 |
| 试剂七   | 液体 5mL×1 瓶   | 2-8°C保存 |
| 标准品   | 液体 1 mL×1 支  | 2-8°C保存 |

溶液的配制：

- 1、试剂二 B：临用前加 2 mL 蒸馏水充分震荡溶解，用不完的试剂-20°C分装保存 4 周，禁止反复冻融；
- 2、试剂二的配制：临用前根据样本量按试剂二 A：试剂二 B=260μL：104μL（共 364μL，7T）的比例配制，现用现配，当天用完。
- 3、试剂三：临用前加 5 mL 蒸馏水充分震荡溶解，2-8°C可以保存 4 周；
- 4、试剂五：临用前加入 5 mL 蒸馏水溶解，用不完的试剂 2-8°C保存 2 周；
- 5、试剂六：临用前加入 5 mL 蒸馏水溶解，用不完的试剂 2-8°C保存 2 周；
- 6、工作液的配制：临用前根据样本量按试剂五：试剂六：试剂七=0.1mL：0.1mL：0.1mL（共 0.3mL，3T）的比例配制，配好的工作液应为浅黄色。若无色则试剂失效，若是蓝色则为磷污染，限当天使用。（**注意：**配制工作液最好使用新的烧杯、玻璃棒和玻璃移液器，或者一次性塑料器皿，以避免磷污染。）
- 7、标准品：10 μmol/mL 磷标准溶液。
- 8、0.1μmol/mL 磷标准溶液的配制：临用前取 0.1mL 10 μmol/mL 标准液和 0.9mL 蒸馏水混合，配制浓度为 1 μmol/mL；再取 0.1mL 1 μmol/mL 标准液和 0.9mL 蒸馏水混合配制成 0.1μmol/mL 磷标准溶液使用。

### 产品说明：

GCL（glutamate cysteine ligase）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Mg<sup>2+</sup>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。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

**需自备的仪器和用品：**

可见分光光度计/酶标仪、冷冻离心机、水浴锅/恒温培养箱、移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、研钵/匀浆器/细胞破碎仪和蒸馏水。

**操作步骤：**

**一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）**

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、细胞：按照细胞数量（10<sup>4</sup> 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。若有浑浊离心后进行测定。

**二、测定步骤**

1、分光光度计或酶标仪预热30min，调节波长到660nm，分光光度计蒸馏水调零。

**2、加样表：**

| 试剂                              | 对照管 | 测定管 | 标准管 | 空白管 |
|---------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| 试剂一（μL）                         | 48  | 48  | -   | -   |
| 试剂二（μL）                         | 52  | 52  |     |     |
| 试剂三（μL）                         | 12  | 12  |     |     |
| 样本（μL）                          | -   | 24  |     |     |
| 混匀后盖紧，37℃水浴准确反应15min；           |     |     |     |     |
| 试剂四（μL）                         | 60  | 60  |     |     |
| 样本（μL）                          | 24  | -   |     |     |
| 混匀后，室温（25℃左右）10000rpm，离心10 min； |     |     |     |     |
| 上清（μL）                          | 100 | 100 | -   | -   |
| 磷标准品（μL）                        | -   | -   | 100 | -   |
| 蒸馏水（μL）                         | -   | -   | -   | 100 |
| 工作液（μL）                         | 100 | 100 | 100 | 100 |

混匀后盖紧，45℃水浴 10min，冷却后测定 660nm 处光吸收，尽快测完。计算 ΔA 测=A 测定管-A 对照管，ΔA 标=A 标准管-A 空白管。空白管和标准管仅需做 1-2 次。

**三、GCL活性计算**

(1) 按蛋白浓度计算

活性单位定义：37℃条件下，每毫克蛋白每分钟催化产生1μmol无机磷的GCL酶活量为1个酶活力单位。

$$\text{GCL活性 (U/mg prot)} = [\Delta A_{\text{测}} \div (\Delta A_{\text{标}} \div C_{\text{标准液}}) \times V_{\text{反总}}] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 0.0544 \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \div C_{\text{pr}}$$

## (2) 按样本质量计算

活性单位定义：37°C条件下，每克样本每分钟催化产生1μmol无机磷的GCL酶活量为1个酶活力单位。

GCL活性 (U/g 质量) =  $[\Delta A_{\text{测}} \div (\Delta A_{\text{标}} \div C_{\text{标准液}}) \times V_{\text{反总}}] \div (W \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T = 0.0544 \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \div W$

## (3) 按细胞数量计算

活性单位定义：37°C条件下，每10<sup>4</sup>个细胞每分钟催化产生1μmol无机磷的GCL酶活量为1个酶活单位。

GCL (U/10<sup>4</sup> cell) =  $[\Delta A_{\text{测}} \div (\Delta A_{\text{标}} \div C_{\text{标准液}}) \times V_{\text{反总}}] \div (N \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$   
=  $0.0544 \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \div N$

## (4) 按照液体体积计算

活性单位定义：37°C条件下，每mL液体每分钟催化产生1μmol无机磷的GCL酶活量为1个酶活单位。

GCL活性 (U/mL) =  $[\Delta A_{\text{测}} \div (\Delta A_{\text{标}} \div C_{\text{标准液}}) \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} \div T = 0.0544 \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}$

V反总：反应总体积，0.196mL；V样：加入样本体积，0.024 mL；Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL；T：反应时间，15min；C标准液：磷标准溶液浓度，0.1μmol/mL；V样总：加入试剂一的体积，1mL；W：样本质量，g；N：细胞数量，以10<sup>4</sup>为单位计算，万个。

### 注意事项：

- 1、样本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、样本测定前先取 1-2 个样做预实验，如吸光值大于 1，应先用试剂一(或者生理盐水)稀释到适当倍数，哺乳动物组织和血液一般稀释 3-5 倍。
- 3、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。
- 4、测定吸光值时请于水浴后 10-40 分钟内测完。

### 实验实例：

- 1、取 0.1g 三叶草加入 1mL 试剂一进行冰浴匀浆。8000g，4°C离心 10min，取上清，置冰上按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算  $\Delta A_{\text{测}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 0.784 - 0.415 = 0.369$ ， $\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}} = 0.371 - 0.042 = 0.329$ ，按样本质量计算酶活得：

GCL (U/g 质量) =  $0.0544 \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \div W = 0.61$  U/g 质量。

- 2、取 0.1g 柳树加入 1mL 试剂一进行冰浴匀浆。8000g，4°C离心 10min，取上清，置冰上按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算  $\Delta A_{\text{测}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 0.530 - 0.366 = 0.164$ ， $\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}} = 0.371 - 0.042 = 0.329$ ，按样本质量计算酶活得：

GCL (U/g 质量) =  $0.0544 \times \Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}} \div W = 0.271$  U/g 质量。

### 相关系列产品：

- BC1170/BC1175 还原型谷胱甘肽 (GSH) 含量检测试剂盒
- BC1180/BC1185 氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 含量检测试剂盒