

γ-谷氨酰半胱氨酸连接酶（GCL）说明书

微量法 100T/96S

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 Mg^{2+} 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：

试剂一：液体 105mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加 6 mL 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 1.5 mL 充分震荡溶解。

试剂四：液体 7mL×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（ 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，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 48μL、试剂二 52μL、试剂三 12μL 和蒸馏水 24μL，混匀后盖紧，37℃ 水浴准确反应 15 min；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 1.5mLEp 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，37℃ 水浴准确反应 15 min；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 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: $y=0.1427x$, $R^2=0.9987$

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℃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。

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

(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。

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

(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。

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

(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。

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

0.1427: 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, 24 μL=2.4×10⁻² mL; V 样总: 提取液体积, 1 mL; 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℃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。

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

(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。

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

(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。

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

$$\begin{aligned} & \text{总}) \div T \\ & = 7.63 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(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。

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

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，24 μL=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℃ 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；