

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：

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（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°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。

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

(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。

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

(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1μg无机磷的GCL酶活性为1个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{GCL } (\mu\text{g}/\text{min} / 104 \text{ cell}) &= [(\text{A测定管}-\text{A空白管}) \div 0.1427 \times \text{V反总}] \div (\text{细胞数量} \times \text{V样} \div \text{V样总}) \div \text{T} \\ &= 3.815 \times (\text{A测定管}-\text{A空白管}) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(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。

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

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，24μL=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，R²=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。

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

(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。

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

(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1μg无机磷的GCL酶活性为1个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{GCL } (\mu\text{g}/\text{min} / 104 \text{ cell}) &= [(\text{A测定管}-\text{A空白管}) \div 0.07135 \times \text{V反总}] \div (\text{细胞数量} \times \text{V样} \div \text{V样总}) \div \text{T} \\ &= 7.63 \times (\text{A测定管}-\text{A空白管}) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(4) 按照液体体积计算

活性单位定义：37°C下，每毫升液体每分钟催化产生1 μ g无机磷的GCL酶活力为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 μ L=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 μ L =2.4 $\times 10^{-2}$ 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；