



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

γ-谷氨酰半胱氨酸连接酶(GCL)活性检测试剂盒(微量法)

货号: R41767

规格: 100T

产品组成及保存条件:

	规格	储存条件
R41767-A	100mL×1瓶	4℃保存;
R41767-B	粉剂×1瓶	4℃保存; 临用前加6mL蒸馏水充分震荡溶解。
R41767-C	粉剂×1瓶	4℃保存; 临用前加入蒸馏水1.5mL充分震荡溶解。
R41767-D	7mL×1瓶	室温保存;
R41767-E	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。

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 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。

自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、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): R41767-A 体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入1mL R41767-A) 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): R41767-A 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500万细胞加入 1mL R41767-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/酶标仪预热 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)
R41767-A	72	48
R41767-B	52	52
R41767-C	12	12
样本上清液		42
混匀后盖紧, 37℃水浴准确反应15min;		
R41767-D	60	30
混匀后, 室温(25℃左右)8000g,离心10 min,取上清100μL,加入新管		
取上清	100	100
R41767-E	100	100
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:

- a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线: $y=0.1427x$, $R^2 = 0.9987$



(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 μ g 无机磷的 GCL 酶活量为 1 个酶活单位。

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

(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 μ g 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 μ g 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 μ g 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: 0.1427: 回归方程系数; V 反总: 反应总体积 (mL) 196 μ L=0.196 mL;
C_{pr}: 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 = 0.024mL; 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

$$\text{标准曲线: } y=0.07135x, R^2 = 0.9987$$

(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 μ g 无机磷的 GCL 酶活量为 1 个酶活单位。



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

(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。

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

注: 0.07135: 回归方程系数; V 反总: 反应总体积 (mL) 196 μL = 0.196 mL;
C_{pr}: 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 = 0.024 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, R41767-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。



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

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 R41767-A (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. R41767-C 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 R41767-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。



源叶