

γ -谷氨酰半胱氨酸连接酶 (glutamate cysteine ligase, GCL) 说明书

分光光度法 50 管/48 样

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：

可见分光光度计、冷冻离心机、水浴锅、移液器、1mL 玻璃比色皿、浓硫酸和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 70mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加 14mL 蒸馏水充分震荡溶解。

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加入蒸馏水 3.5 mL 充分震荡溶解。

试剂四：液体 16mL×1 瓶，室温保存。

试剂五：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加入 30mL 蒸馏水，充分震荡溶解后，缓缓加入 1.0 mL 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. 分光光度计预热 30min，调节波长到 660 nm，蒸馏水调零。
2. 空白管：取 1.5mLEp 管，依次加入试剂一 240 μ L、试剂二 260 μ L、试剂三 60 μ L 和蒸馏水 120 μ L，混匀后盖紧，37℃ 水浴准确反应 15 min；再加入试剂四 300 μ L，混匀后，25℃、8000g，离心 10 min，取上清 500 μ L，加入试剂五 500 μ L，混匀后盖紧，45℃ 水浴 10min，冷却后测定 660 nm 处吸光值，记为 A 空白管。
3. 测定管：取 1.5mLEp 管，依次加入试剂一 240 μ L、试剂二 260 μ L、试剂三 60 μ L 和上清液 120 μ L，混匀后盖紧，37℃ 水浴准确反应 15 min；再加入试剂四 300 μ L，混匀后，25℃、8000g，离心 10 min，取上清 500 μ L，加入试剂五 500 μ L，混匀后盖紧，45℃ 水浴 10min，冷却后测定 660 nm 处吸光值，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: $y=0.1427x$, $R^2=0.9987$

(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。

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

(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 1 μ g 无机磷的 GCL 酶活量为 1 个酶活单位。

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

(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 1 μ g 无机磷的 GCL 酶活量为 1 个酶活单位。

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

(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。

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

0.1427: 回归方程系数; V 反总: 反应总体积 (mL) 980 μ L=0.980mL; 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, 120 μ L =0.12 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; W: 样本质量,

g; 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;