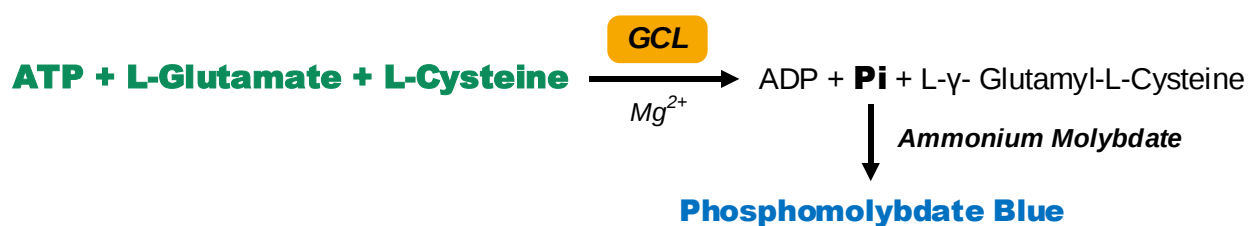




γ -谷氨酰半胱氨酸连接酶（GCL）活性检测试剂盒
Glutamate Cysteine Ligase (GCL) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



γ-谷氨酰半胱氨酸连接酶（GCL）活性检测试剂盒

Glutamate Cysteine Ligase (GCL) Activity Assay Kit

一、产品描述

γ-谷氨酰半胱氨酸连接酶（GCL）又称谷氨酰-L-半胱氨酸连接酶，是谷胱甘肽（GSH）生物合成途径的限速酶，谷胱甘肽对其具有反馈抑制作用。γ-谷氨酰半胱氨酸连接酶基因的表达受氧化剂、抗氧化剂、生长因子和炎症因子等多种因素调节，其活性对谷胱甘肽含量、GSH/GSSG 比值和谷胱甘肽生物合成能力具有重要影响。

γ-谷氨酰半胱氨酸连接酶可催化谷氨酸和半胱氨酸合成 γ-谷氨酰半胱氨酸，同时使 ATP 去磷酸化生成无机磷，通过钼蓝法测定无机磷的增加速率即可表征 γ-谷氨酰半胱氨酸连接酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用说明及注意事项
试剂一	液体 80 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂二	粉剂×1 瓶	-20°C保存	使用前加入 6 mL 蒸馏水充分溶解 (配置后-20°C分装保存，避免反复冻融)
试剂三	粉剂×3 支	4°C避光保存	使用前每支加入 1 mL 蒸馏水充分溶解 (现用现配，配置后 4°C可保存 1 周)
试剂四	液体 8 mL×1 瓶	4°C避光保存	-
试剂五	粉剂×2 瓶	4°C避光保存	使用前每瓶加入 9 mL 蒸馏水充分溶解 再缓慢加入 300 μL 浓硫酸充分混匀 (若变为蓝色则停止使用)
标准液	液体 1 mL×1 支	4°C保存	1 μmol/mL 磷标准液
标准应用液的制备：使用前将 1 μmol/mL 磷标准液使用蒸馏水稀释 10 倍至 0.1 μmol/mL 即为标准应用液。			

需自备试剂：浓硫酸（H₂SO₄，MM = 98.08，CAS: 7664-93-9）

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿（光径 10 mm）/96 孔板、研钵/匀浆器、可调式移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱、浓硫酸和蒸馏水。

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.

Not for further distribution without written consent. Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

1.粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

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 0.1 g 组织，加入 1 mL 试剂一）处理样品，冰浴匀浆，4℃ 10000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

②细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，按照细菌或细胞数量(10^4 个):试剂一体积(mL)为（500-1000）: 1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 试剂一）处理样品，冰浴超声破碎（功率 300 W，超声 3 s，间隔 7 s，总时间 3 min），4℃ 10000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

③血清（浆）、培养液等液体样本：直接检测或适当稀释后再进行检测。

2.测定步骤

①分光光度计/酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 660 nm，蒸馏水调零。

②在离心管中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)	对照组 (μL)	标准组 (μL)	空白组 (μL)
试剂一	50	50	-	-
试剂二	50	50	-	-
试剂三	15	15	-	-
粗酶液	25	-	-	-
充分混匀，37℃准确反应 15 min				
试剂四	60	60	-	-
粗酶液	-	25	-	-
充分混匀，10000 g 常温离心 10 min，取上清				
在 96 孔板或离心管中依次加入下列试剂：				
上清液	100	100	-	-
标准应用液	-	-	100	-
蒸馏水	-	-	-	100
试剂五	100	100	100	100
充分混匀，45℃显色 10 min，冷却至室温				

吸光值测定（30 min 内完成测定）：测定 660 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 对照、A 标准和 A 空白；计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。注：每个样品均需设一个对照组，空白组只需测定 1-2 次。

3. γ -谷氨酰半胱氨酸连接酶（GCL）活性计算

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟催化生成 1 μmol 无机磷所需酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{GCL (U/mg prot)} = \frac{C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测定}} \times V_{\text{酶促}}}{\Delta A_{\text{标准}} \times C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{0.0533 \times \Delta A_{\text{测定}}}{C_{\text{pr}} \times \Delta A_{\text{标准}}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织每分钟催化生成 1 μmol 无机磷所需酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{GCL (U/g)} = \frac{C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测定}} \times V_{\text{酶促}} \times V_{\text{样总}}}{\Delta A_{\text{标准}} \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{0.0533 \times \Delta A_{\text{测定}}}{W \times \Delta A_{\text{标准}}}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟催化生成 1 μmol 无机磷所需酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{GCL (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测定}} \times V_{\text{酶促}} \times V_{\text{样总}}}{\Delta A_{\text{标准}} \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{0.0533 \times \Delta A_{\text{测定}}}{\text{细菌或细胞数量} \times \Delta A_{\text{标准}}}$$

④按液体样本体积计算

单位定义：每 mL 液体样本每分钟催化生成 1 μmol 无机磷所需酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{GCL (U/mL)} = \frac{C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测定}} \times V_{\text{酶促}}}{\Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{0.0533 \times \Delta A_{\text{测定}}}{\Delta A_{\text{标准}}}$$

注释：C 标：标准应用液浓度，0.1 $\mu\text{mol/mL}$ ；V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，25 μL =0.025 mL；V 酶促：酶促反应体系总体积，200 μL =0.2 mL；V 样总：粗酶液总体积，1 mL；W：样品质量，g；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；细胞或细胞数量：以万计；T：酶促反应时间：15 min。

四、注意事项

- ①粗酶液制备过程应在冰上操作，且尽快完成酶活性测定，以免失活影响结果；
- ②若 A 测定大于 1.0（96 孔板大于 0.5），建议将粗酶液稀释后再进行测定，计算时相应修改；
- ③试剂三配置后有效期较短，为便于试验安排，附赠一支作为备用，每支均可满足至少 30 个样本的测定；
- ④试剂五配置时若出现黑色不溶物属正常现象，吸取澄清溶液使用即可；
- ⑤为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

