γ-谷氨酰半胱氨酸连接酶（GCL）活性检测试剂盒（可见分光光度法）

产品货号：BA1031

产品规格：50管/48样

产品说明：

GCL（glutamate cysteine ligase）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。

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。

注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品内容：

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体40mL×1瓶	4℃
试剂二	粉剂×1瓶	-20℃
试剂三	粉剂×1瓶	4℃
试剂四	液体16mL×1瓶	4℃
试剂五	粉剂×1瓶	4℃
标准品	液体1mL×1支	4℃

溶液的配制：

1. 试剂二：临用前加14mL蒸馏水充分震荡溶解，用不完的试剂-20℃分装保存，禁止反复冻融；
2. 试剂三：临用前加3.5mL蒸馏水充分震荡溶解；
3. 试剂五：临用前加入30mL蒸馏水，充分震荡溶解后，缓缓加入1.0mL浓硫酸（自备），边加边搅拌；
4. 标准品：1μmol/mL磷标准溶液。临用前将标准液用蒸馏水稀释成0.1 μmol/mL 磷标准溶液。

需自备的仪器和用品：

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

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

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、细胞：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。

二、测定步骤

1. 分光光度计预热30min以上，调节波长至660nm，蒸馏水调零。
2. 加样表：

试剂（μL）	对照管	测定管	标准管	空白管
试剂一	240	240		
试剂二	260	260		

扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd
地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号
电话：400-611-0007 13671551480
Q Q：807961520
邮箱：saintbio@126.com
http://www.saint-bio.com

试剂三	60	60		
样本	-	120		
混匀后盖紧，37℃水浴准确反应15min；				
试剂四	300	300		
样本	120	-		
混匀后，室温（25℃左右）10000rpm，离心10min；				
上清	500	500	-	-
磷标准品	-	-	500	-
蒸馏水	-	-	-	500
试剂五	500	500	500	500
混匀后盖紧，45℃水浴10min，冷却后测定660nm处光吸收，尽快测完。计算ΔA测=A测定管-A对照管，ΔA标=A标准管-A空白管。				

三、总糖含量计算

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1μmol无机磷的GCL酶活量为1个酶活力单位。

   GCL（U/mg prot）=[ΔA测÷（ΔA标÷C标准液）×V反总]÷(Cpr×V样)÷T=0.0544×ΔA测÷ΔA标÷Cpr

2. 按样本质量计算

   活性单位定义：37℃下，每克样本每分钟催化产生1μmol无机磷的GCL酶活量为1个酶活力单位。

   GCL（U/g 质量）=[ΔA测÷（ΔA标÷C标准液）×V反总]÷(W÷V样总×V样)÷T

   =0.0544×ΔA测÷ΔA标÷W

3. 按细胞数量计算

   活性单位定义：37℃下，每10^4个细胞每分钟催化产生1μmol无机磷的GCL酶活量为1个酶活单位。

   GCL（U/10^4cell）=[ΔA测÷（ΔA标÷C标准液）×V反总]÷(细胞数量×V样÷V样总)÷T

   =0.0544×ΔA测÷ΔA标÷细胞数量

4. 按照液体体积计算

   活性单位定义：37℃下，每mL液体每分钟催化产生1μmol无机磷的GCL酶活量为1个酶活单位。

   GCL（U/mL）=[ΔA测÷（ΔA标÷C标准液）×V反总]÷V样÷T

   =0.0544×ΔA测÷ΔA标

V反总：反应总体积，0.98mL；V样：加入样本体积，0.12mL；Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL；T：反应时间，15min；C标准液：磷标准溶液浓度，0.1μmol/mL；V样总：加入试剂一的体积，1mL；W：样本质量，g；细胞数量：以10^4为单位计算，万个。

注意事项：

1. 样本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. 样本测定前先取1-2个样做预实验，如吸光值大于1，应先用试剂一(或者生理盐水)稀释到适当倍数，哺乳动物组织和血液一般稀释3-5倍。
3. 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。
4. 试剂三配制完成后，请一周内使用完。
5. 试剂五配制过程中，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。该溶液配制完成后应为浅黄色，若为蓝色则已污染，不可再使用。
6. 测定吸光值时请于水浴后10-40分钟内测完。

扫一扫 加微信
上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd
地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号
电话：400-611-0007 13671551480
Q Q：807961520
邮箱：saintbio@126.com
http://www.saint-bio.com