

γ-谷氨酰半胱氨酸连接酶（GCL）检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1028

保存：-20℃保存 6 个月

规格：48T/96T

检测范围：0.0125-0.8 μmol/mL (0.0675-4.32U/g) 灵敏度：0.0125 μmol/mL (0.0675 U/g)

适用样本：血清（浆）、动植物组织、细胞、细菌、真菌

产品简介

γ-谷氨酰半胱氨酸连接酶（GCL）是还原型谷胱甘肽（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 活性的高低对于 GSH 含量和 GSH/GSSG 比值有非常重要的影响。本试剂盒可检测生物体内 GCL 活性，其原理是在 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。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
提取液	50 mL	100 mL	4℃保存
试剂一	1	1	-20℃保存
试剂二	1	1	4℃保存
试剂三	3.5 mL	7 mL	4℃保存
试剂四	1	1	4℃保存
标准品	0.5mL	1mL	4℃保存

自备耗材

酶标仪或可见分光光度计（能测 660 nm 处的吸光度）及水浴锅
 96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头
 低温离心机、制冰机
 去离子水和浓硫酸
 匀浆器（如果是组织样本）

试剂准备

注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。

提取液：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂一：临用前 96 T 加 6 mL 去离子水，48 T 加 3 mL 去离子水，充分震荡溶解，用不完的试剂分装-20℃保存，避免反复冻融。

试剂二：临用前加 96 T 加 1.5 mL 去离子水，48 T 加 0.75 mL 去离子水，充分震荡溶解。（配制完成后，4℃保存，请一周内使用完。）

试剂三：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂四：临用前 96 T 加 12 mL 去离子水，48 T 加 6 mL 去离子水，充分震荡溶解后，96 T 缓缓加入 400 μL 浓硫酸（自备），48 T 缓缓加入 200 μL 浓硫酸（自备）边加边搅拌。

产品说明书

注意：浓硫酸具有强腐蚀性，请注意安全。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。

标准曲线设置：按下表所示用去离子水将 $8 \mu\text{mol/mL}$ 标准液稀释成 0.8、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0.125 $\mu\text{mol/mL}$ 标准溶液。

	标准品体积	去离子水体积 (μL)	标准品浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)
Std. 1	100 μL of $8 \mu\text{mol/mL}$	900	0.8
Std. 2	100 μL of Std. 1 ($0.8 \mu\text{mol/mL}$)	100	0.4
Std. 3	100 μL of Std. 2 ($0.4 \mu\text{mol/mL}$)	100	0.2
Std. 4	100 μL of Std. 3 ($0.2 \mu\text{mol/mL}$)	100	0.1
Std. 5	100 μL of Std. 4 ($0.1 \mu\text{mol/mL}$)	100	0.05
Std. 6	100 μL of Std. 5 ($0.05 \mu\text{mol/mL}$)	100	0.025
Std. 7	100 μL of Std. 6 ($0.025 \mu\text{mol/mL}$)	100	0.0125

注意：每次实验，请使用新配制的标准品。

样本制备

- 动植物组织样本：称取约 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液，进行冰浴匀浆，8,000 g，4℃ 离心 10 min，取上清，置冰上待测。
- 细菌、真菌、细胞：收集 500 万细胞加入 1 mL 提取液，冰浴超声波破碎细胞 5 min（功率 20% 或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次）；然后 8,000 g，4℃，离心 10 min，取上清置于冰上待测。
- 血清（浆）等液体：直接测定。

注意：1. 推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在 -80℃ 保存 1 个月。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. 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 的提取时可加提取液后超声波处理，不能用细胞裂解液处理细胞。

3. 如需要进行样本蛋白质浓度测定时，推荐用 BCA 法蛋白质定量试剂盒。

实验步骤

- 酶标仪或可见分光光度计预热 30 min 以上，调节波长到 660 nm，可见分光光度计去离子水调零。
- 水浴锅预热到 37℃。
- 样本测定（在 EP 管中依次加入下列试剂）：

	空白管 (μL)	标准管 (μL)	测定管 (μL)	对照管 (μL)
提取液	0	0	48	48
试剂一	0	0	52	52
试剂二	0	0	12	12
样本	0	0	24	0
混匀后盖紧，37℃ 水浴反应 15 min				
试剂三	0	0	60	60
样本	0	0	0	24

产品说明书

混匀后，室温（25℃左右）8,000 g，离心 10 min

上清	0	0	100	100
标准品	0	100	0	0
去离子水	100	0	0	0
试剂四	100	100	100	100

混匀后盖紧，45℃水浴 10min，冷却至室温后测定 660 nm 处光吸收，尽快测完，分别记为 $A_{\text{空}}$ 、 $A_{\text{测定}}$ 、 $A_{\text{标}}$ 、 $A_{\text{对照}}$ 。计算 $\Delta A_{\text{测}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ ，空白管只需做一个

注意：测定吸光值时，请于水浴后 10-40min 内测完。样本测定前先取 2-3 个样做预实验，如 $\Delta A_{\text{测}}$ 大于 1.5，应先用提取液（或生理盐水）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，计算公式中乘以相应稀释倍数。

结果计算

1. 标准曲线的绘制：

以标准溶液浓度为 y 轴， $\Delta A_{\text{标}}$ 为 x 轴，绘制标准曲线（浓度为 y 轴更方便计算结果）。

2. γ -谷氨酰半胱氨酸连接酶（GCL）活性的计算

根据标准曲线，将 $\Delta A_{\text{测}}$ 带入公式中（ x ）计算样品无机磷浓度 y （ $\mu\text{mol/mL}$ ）。

（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 1 μmol 无机磷的 GCL 酶活性为 1 个酶活力单位。

$$\text{GCL (U/mg prot)} = (y \times V_{\text{反总}}) \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 0.54 \times y \div \text{Cpr}$$

（2）按样本鲜重计算

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

$$\text{GCL (U/g 鲜重)} = (y \times V_{\text{反总}}) \div (W \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T = 0.54 \times y \div W$$

（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 1 μmol 无机磷的 GCL 酶活性为 1 个酶活力单位。

$$\text{GCL (U/10}^4 \text{ cell)} = (y \times V_{\text{反总}}) \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.08 \times 10^{-3} \times y$$

（4）按血清（浆）等液体体积计算

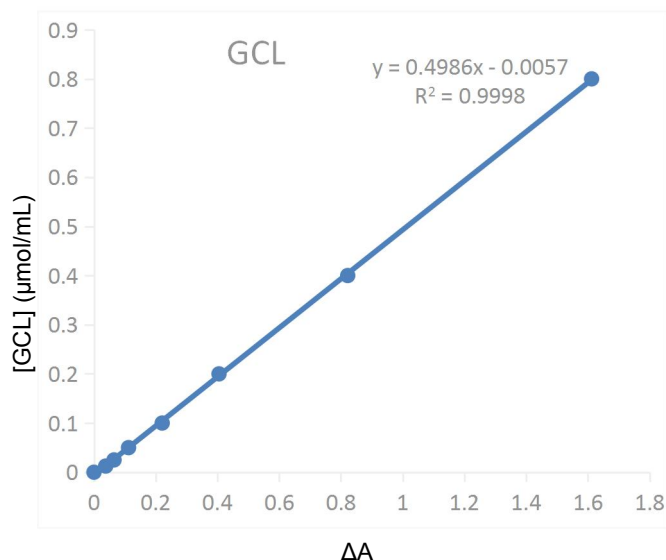
活性单位定义：37℃下，每毫升液体每分钟催化产生 1 μmol 无机磷的 GCL 酶活性为 1 个酶活力单位。

$$\text{GCL (U/mL)} = (y \times V_{\text{反总}}) \div V_{\text{样}} \div T = 0.54 \times y$$

$V_{\text{反总}}$ ：反应总体积，0.196 mL； Cpr ：上清液蛋白质浓度，mg/mL； $V_{\text{样}}$ ：加入样品体积，0.024 mL； T ：反应时间，15 min； W ：样品鲜重，g； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液的体积，1 mL；500：细菌或细胞总数，500 万

结果展示

典型标准曲线-以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线。



产品说明书

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

PMK1023 还原型谷胱甘肽（GSH）检测试剂盒（微量法）
PMK1024 氧化型谷胱甘肽（GSSG）检测试剂盒（微量法）
PMK1022 谷胱甘肽还原酶（GR）检测试剂盒（微量法）
PMK1027 谷胱甘肽 S-转移酶（GST）检测试剂盒（微量法）



更多产品详情了解，请关注公众号：