

γ -谷氨酰半胱氨酸连接酶（GCL）活性测试盒

比色法：50T/24 样

一、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 分解产生无机磷，通过测定无机磷增加速率，即可计算出 GCL 活性。

二、自备仪器用品：

低温离心机、可见分光光度计、水浴锅、1mL 玻璃比色皿、浓硫酸、蒸馏水

三、试剂组成和配制：

试剂一：液体×1 瓶，4° C 保存；

试剂二：粉剂×1 瓶，4° C 保存，临用前加 14mL 蒸馏水充分震荡溶解；试剂三：粉剂×1 瓶，4° C 保存，临用前加 3.5mL 蒸馏水充分震荡溶解；试剂四：液体×1 瓶，室温保存；

试剂五：粉剂×1 瓶，4° C 保存，临用前加 30mL 蒸馏水充分震荡溶解，缓缓加入 1.0mL 浓硫酸，边加边搅拌。

四、样品前处理：

样本粗酶液提取详见说明书。测定组织和细胞同时需要测定蛋白浓度。

可用总蛋白定量测试盒（考马斯亮蓝法）或者 总蛋白定量测试盒(BCA 法)进行蛋白浓度的测定。

六、GCL 测定步骤

1. 分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 660nm，用蒸馏水调零；
2. 空白管：

(1) 依次加入双蒸水 120 μ L、试剂一 240 μ L、试剂二 260 μ L 和试剂三 60 μ L，混匀后盖紧，37° C 水浴准确反应 15 分钟；

(2) 加入试剂四 300 μ L，混匀后，室温（25° C 左右）下 10000rpm 离心 10 分钟，取上清 500 μ L 待测；

(3) 加入试剂五 500 μ L，混匀后盖紧，45° C 水浴 10 分钟，冷却后测定 660nm 处吸光率，对大量样品，空白管只需做 1-2 个。

3. 测定管：

(1) 依次加入试剂一 240 μ L、试剂二 260 μ L、试剂三 60 μ L 和前处理样品上清 120 μ L，混匀后盖紧，

37° C 水浴准确反应 15 分钟；

(2) 加入试剂四 300 μ L，混匀后，室温（25° C 左右）下 10000rpm 离心 10 分钟，取上清 500 μ L 待测；

(3) 加入试剂五 500 μ L，混匀后盖紧，45° C 水浴 10 分钟，冷却后测定 660nm 处吸光率，计算 $\Delta A=A$

测定管-A 空白管。

注：吸光率需在水浴完成后尽快测定完成。