

γ-谷氨酰转肽酶 (γ-GT) 试剂盒说明书

微量法 100T/96S

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：

γ-GT是γ-谷氨酰循环中的关键酶，催化GSH降解。γ-GT催化GSH或者其他γ-谷氨酰基化合物上的γ-谷氨酰基转移到受体。也可以催化GSH和其他γ-谷氨酰基化合物的水解，产生谷氨酸盐，在细胞外谷胱甘肽新陈代谢中起了重要的作用。

测定原理：

γ-GT催化谷氨酰对硝基苯胺中γ-谷氨酰基转移给N-甘氨酸甘氨酸，生成对硝基苯胺，在405nm有特征光吸收；通过测定405nm光吸收增加速率，来计算γ-GT酶活性。

自备仪器和用品：

低温离心机、水浴锅、可调节移液器、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96孔板、和蒸馏水

试剂组成和配制：

试剂一：液体100mL×1瓶，4℃保存。

试剂二：粉剂×1瓶，4℃保存。

试剂三：液体4mL×1瓶，4℃保存。

试剂四：液体14.8mL×1瓶，4℃保存。

工作液（在试剂二瓶中配制）：临用前配制，把试剂三倒入试剂二瓶中，充分溶解（室温过低时可以40℃水浴促进溶解）；然后把试剂四倒入试剂二瓶中，混匀后室温保存。

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15min，取上清，置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量（10⁴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15min，取上清置于冰上待测。
3. 血清等液体：直接测定。

γ-GT测定操作：

1. 分光光度计/酶标仪预热30min，调节波长到405 nm，蒸馏水调零。
2. 试剂二置于25℃（一般物种）或者37℃（哺乳动物）水浴中预热30min（保证无沉淀）。
3. 测定管：取微量玻璃比色皿或96孔板，依次加入20μL上清液，180μL工作液，混匀后于405nm测定10s和70s时吸光度，记为A1和A2。

γ-GT活性计算：

标准曲线： $y=0.006x+0.0016$ ，x为对硝基苯胺浓度，y为吸光值， $R^2=0.999$ 。

a.使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1). 按蛋白浓度计算

活性单位定义：25℃或者37℃中，每毫克蛋白每分钟催化产生1μmol对硝基苯胺为1个酶活单位。

$$\gamma\text{-GT } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(A2-A1)-0.0016] \div 0.006 \times V_{\text{反总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T$$

$$= 1.67 \times [(A2-A1)-0.0016] \div C_{\text{pr}}$$

(2). 按样本质量计算

活性单位定义：25°C或者37°C中，每克样本每分钟催化产生1 μmol 对硝基苯胺为1个酶活单位。

$$\gamma\text{-GT } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(A2-A1)-0.0016] \div 0.006 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 1.67 \times [(A2-A1)-0.0016] \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：25°C或者37°C中，每104个细胞每分钟催化产生1 μmol 对硝基苯胺为1个酶活单位。

$$\gamma\text{-GT } (\mu\text{mol}/\text{min}/104 \text{ cell}) = [(A2-A1)-0.0016] \div 0.006 \times V_{\text{反总}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 1.67 \times [(A2-A1)-0.0016] \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：25°C或者37°C中，每毫升液体每分钟催化产生1 μmol 对硝基苯胺为1个酶活单位。

$$\gamma\text{-GT } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = [(A2-A1)-0.0016] \div 0.006 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T$$

$$= 1.67 \times [(A2-A1)-0.0016]$$

V反总：反应体系总体积 (L)，200 μL =2 \times 10⁻⁴L；Cpr：蛋白浓度 (mg/mL)；W：样品质量；V样：反应体系中加入上清液体积 (mL)，20 μL =0.02 mL；V样总：提取液体积，1 mL；T：反应时间 (min)，1min。

b.使用96孔板测定的计算公式如下

标准曲线：y=0.003x+0.0016，x为对硝基苯胺浓度，y为吸光值，R²=0.999。

(1). 按蛋白浓度计算

活性单位定义：25°C或者37°C中，每毫克蛋白每分钟催化产生1 μmol 对硝基苯胺为1个酶活单位。

$$\gamma\text{-GT } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(A2-A1)-0.0016] \div 0.003 \times V_{\text{反总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T$$

$$= 3.34 \times [(A2-A1)-0.0016] \div C_{\text{pr}}$$

(2). 按样本质量计算

活性单位定义：25°C或者37°C中，每克样本每分钟催化产生1 μmol 对硝基苯胺为1个酶活单位。

$$\gamma\text{-GT } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(A2-A1)-0.0016] \div 0.003 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 3.34 \times [(A2-A1)-0.0016] \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：25°C或者37°C中，每104个细胞每分钟催化产生1 μmol 对硝基苯胺为1个酶活单位。

$$\gamma\text{-GT } (\mu\text{mol}/\text{min}/104 \text{ cell}) = [(A2-A1)-0.0016] \div 0.003 \times V_{\text{反总}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 3.34 \times [(A2-A1)-0.0016] \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：25°C或者37°C中，每毫升液体每分钟催化产生1 μmol 对硝基苯胺为1个酶活单位。

$$\gamma\text{-GT } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = [(A2-A1)-0.0016] \div 0.003 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T$$

$$= 3.34 \times [(A2 - A1) - 0.0016]$$

V反总：反应体系总体积（L）， $200\mu\text{L}=2 \times 10^{-4}\text{L}$ ；Cpr：蛋白浓度（mg/mL）；W：样品质量，g；V样：反应体系中加入上清液体积（mL）， $20\mu\text{L}=0.02\text{ mL}$ ；V样总：提取液体积，1 mL；T：反应时间（min），1min。

注意事项：

培养细胞中 γ -GT活性测定时，细胞数目须在300万-500万之间，细胞中 γ -GT的提取时可加试剂一后研磨或超声波处理，不能用细胞裂解液处理细胞（防止因为蛋白质变性导致酶失活）。

配置好的工作液2周内使用完毕。

www.affandi-e.com