

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0335

Size: 100T/96S

γ-谷氨酰转肽酶(γ-GT)检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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。

二、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。

三、需自备的仪器和用品:

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。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	4°C 保存	
试剂三	液体×1 瓶	4°C 保存	
试剂四	液体×1 瓶	4°C 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°C 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

五、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°C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°C, 离心15min, 取上清置于冰上待测。
3. 血清等液体：直接测定。

六、γ-GT 测定操作：

1. 分光光度计/酶标仪预热30min, 调节波长到405nm, 蒸馏水调零。
2. 试剂二置于25°C (一般物种) 或者37°C (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20 μL上清液, 180 μL工作液, 混匀后于405nm 测定10s和70s时吸光度, 记为A1和A2。

七、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, $R^2=0.999$ 。

● 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°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。

$$\gamma\text{-GT} (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(A2-A1) - 0.0016] \div 0.006 \times V_{\text{反总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T$$
$$= 1.67 \times [(A2-A1) - 0.0016] \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$\gamma\text{-GT} (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}) = [(A2-A1) - 0.0016] \div 0.006 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 1.67 \times [(A2-A1) - 0.0016] \div W$$

(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。

$$\gamma\text{-GT} (\mu\text{mol}/\text{min}/10^4\text{cell}) = [(A2-A1) - 0.0016] \div 0.006 \times V_{\text{反总}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.67 \times [(A2-A1) - 0.0016] \div \text{细胞数量}$$

(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=2×10⁻⁴ L；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。

● 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。

$$\gamma\text{-GT} (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(A2-A1) - 0.0016] \div 0.003 \times V_{\text{反总}} \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T \\ = 3.34 \times [(A2-A1) - 0.0016] \div Cpr$$

(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。

$$\gamma\text{-GT} (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}) = [(A2-A1) - 0.0016] \div 0.003 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 3.34 \times [(A2-A1) - 0.0016] \div W$$

(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。

$$\gamma\text{-GT} (\mu\text{mol}/\text{min}/10^4\text{cell}) = [(A2-A1) - 0.0016] \div 0.003 \times V_{\text{反总}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3.34 \times [(A2-A1) - 0.0016] \div \text{细胞数量}$$

(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 μL=2×10⁻⁴ 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 μL=0.02 mL；V样总：提取液体积，1 mL；T：反应时间 (min)，1min。

八、注意事项：

1. 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）。
2. 配置好的工作液 2 周内使用完毕。