

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-S0608

Size: 50T/48S

γ-谷氨酰转肽酶(γ-GT)检测试剂盒说明书

可见分光光度法

*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:

可见分光光度计、低温离心机、水浴锅、可调节移液器、1mL玻璃比色皿和蒸馏水

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℃保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体×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			

五、操作步骤：

● 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。

六、γ-GT 测定操作

1. 分光光度计预热 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 1mL 玻璃比色皿，依次加入 100 μL 上清液，900 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 活性计算公式

标准曲线：y=0.006x+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℃或者 37℃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℃或者 37℃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。

$$\gamma\text{-GT} (\mu\text{mol/min/g}) = [(A_2 - A_1) - 0.0016] \div 0.006 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 1.67 \times [(A_2 - A_1) - 0.0016] \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：25℃或者37℃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。

$$\gamma\text{-GT} (\mu\text{mol/min}/10^4 \text{ cell}) = [(A_2 - A_1) - 0.0016] \div 0.006 \times V_{\text{反总}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.67 \times [(A_2 - A_1) - 0.0016] \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：25℃或者37℃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。

$$\gamma\text{-GT} (\mu\text{mol/min/mL}) = [(A_2 - A_1) - 0.0016] \div 0.006 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T$$
$$= 1.67 \times [(A_2 - A_1) - 0.0016]$$

V反总：反应体系总体积 (L)，1000 μL=0.001 L；Cpr：蛋白浓度 (mg/mL)；V样：反应体系中加入上清液体积 (mL)，100 μL=0.1 mL；V样总：加入提取液体积，1mL；W，样本质量，g；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。