

上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

γ-谷氨酰转肽酶(γ-GT)活性测定试剂盒说明书

微量法

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：

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

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 μ L上清液, 180 μ L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°C或者37°C中, 每毫克蛋白每分钟催化产生1 μ mol对硝基苯胺为1个酶活单位。

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

(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 μ mol对硝基苯胺为1个酶活单位。

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

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义: 25°C或者37°C中, 每 10^4 个细胞每分钟催化产生1 μ mol对硝基苯胺为1个酶活单位。

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

(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 μ mol对硝基苯胺为1个酶活单位。

$$\begin{aligned} \gamma\text{-GT} (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) &= [(A2-A1) - 0.0016] \div 0.006 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 1.67 \times [(A2-A1) - 0.0016] \end{aligned}$$

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积 (L), $200 \mu\text{L}=2 \times 10^{-4} \text{L}$; C_{pr} : 蛋白浓度 (mg/mL); W : 样品质量; $V_{\text{样}}$: 反应体系中加入上清液体积 (mL), $20 \mu\text{L}=0.02 \text{mL}$; $V_{\text{样总}}$: 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, $R^2=0.999$ 。

(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 μ mol对硝基苯胺为1个酶活单位。

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

(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 μ mol对硝基苯胺为1个酶活单位。

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

(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。

$$\begin{aligned} \gamma\text{-GT} (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) &= [(A2-A1) - 0.0016] \div 0.003 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 3.34 \times [(A2-A1) - 0.0016] \end{aligned}$$

V_{反总}：反应体系总体积 (L)，200 μL=2×10⁻⁴ L；C_{pr}：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。

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。