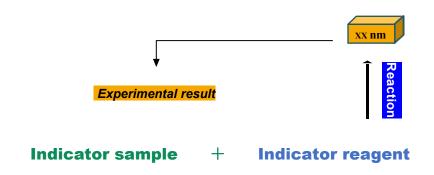


上海茁彩生物科技有限公司

Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图



γ-谷氨酰转肽酶(γ-GT)活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

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。

产品内容:

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°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

产品说明:

 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。

γ-GT催化谷氨酰对硝基苯胺中γ-谷氨酰基转移给N-甘氨酰甘氨酸,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:

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

操作步骤:

一、粗酶液提取

- 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。

二、 y-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 μ L上清液, 900 μ L工作液, 混匀后于405nm测定10 s和70 s时吸光度, 记为A1和A2。



三、 y-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°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。 γ-GT (μ mol/min/mg prot) =[(A2-A1) -0.0016]÷0.006×V反总÷ (Cpr×V样)÷T =1.67 × [(A2-A1) -0.0016] ÷ 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1μmol对硝基苯胺为1个酶活单位。 γ-GT (μmol/min/g) =[(A2-A1) -0.0016] ÷0.006×V反总÷(W×V样÷V样总)÷T =1.67 × [(A2-A1) -0.0016] ÷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1μmol对硝基苯胺为1个酶活单位。 γ-GT (μmol/min/10⁴ cell) =[(A2-A1)-0.0016]÷0.006×V反总÷(细胞数量×V样÷V样总) ÷T

(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1μmol对硝基苯胺为1个酶活单位。 γ-GT (μmol/min/mL) = [(A2-A1) -0.0016]÷0.006×V反总÷V样÷T = 1.67 × 「 (A2-A1) -0.0016]

V反总: 反应体系总体积(L), 1000 μ L=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 μ L=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。

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。

Shanghai ZCIBIO Technology Co.,Ltd. TEL:021-65681082 Email:zcibio@163.com www.zcibio.com