

γ-谷氨酰转肽酶 (γ-glutamyltranspeptidase, γ-GT) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

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。

组成:

产品名称	GSH017-50T/48S	Storage
试剂一: 液体	50ml	4°C
试剂二: 粉剂	1 瓶	4°C
试剂三: 液体	10ml	4°C
试剂四: 液体	37ml	4°C
说明书	一份	

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。

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

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。

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



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°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 1ml 玻璃比色皿, 依次加入 **100μl 上清液**, 900μl 工作液, 混匀后于 405nm 测定 10 s 和 70 s 时吸光度, 记为 A1 和 A2。

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, $R^2=0.999$ 。

(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 1μmol 对硝基苯胺为 1 个酶活单位。

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

(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 1μmol 对硝基苯胺为 1 个酶活单位。

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

(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 1μmol 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 1μmol 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), 1000μl=0.001 L; Cpr : 蛋白浓度 (mg/ml); $V_{\text{样}}$: 反应体系中加入上清液体积 (ml), 100μl=0.1 ml; $V_{\text{样总}}$: 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。

