

## γ-谷氨酰转肽酶 (γ-GT) 试剂盒说明书

微量法 100T/96S

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	GSH018-100T/96S	Storage
试剂一：液体	100ml	4°C
试剂二：粉剂	1 瓶	4°C
试剂三：液体	4ml	4°C
试剂四：液体	14.8ml	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：

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

### 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 (10<sup>4</sup> 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/酶标仪预热 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:** 取微量玻璃比色皿或 96 孔板, 依次加入 20μl 上清液, 180μl 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 1μmol 对硝基苯胺为 1 个酶活单位。

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

#### (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 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 10<sup>4</sup> 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 反总: 反应体系总体积 (L), 200μl=2×10<sup>-4</sup>L; C<sub>pr</sub>: 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), 20μl=0.02 ml; V 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 1μmol 对硝基苯胺为 1 个酶活单位。

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

#### (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 1μmol 对硝基苯胺为 1 个酶活单位。

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

#### (3) 按细胞数量计算

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



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

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

(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。

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

V 反总：反应体系总体积 (L)，200μl=2×10<sup>-4</sup>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)，20μl=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。

