

γ-谷氨酰转移酶(γ-glutamyltranspeptidase)活性测定试剂盒

(货号: G0434F 分光法 48 样)

一、产品简介:

γ-谷氨酰转移酶(γ-glutamyltranspeptidase, γ-GT, EC 2.3.2.2), 又称γ-谷氨酰转肽酶, 催化谷胱甘肽、S-取代谷胱甘肽和其它γ-谷氨酰化合物上的γ-谷氨酰基的转移; 该酶广泛分布于生物体内, 是谷氨酰循环中的关键酶, 在氨基酸转运过程中起重要的作用, 故它是反映生物体代谢的一个重要指标。

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, 通过测定对硝基苯胺在 410nm 光吸收增加速率, 来计算γ-GT 酶活性大小。

二、测试盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 40mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉体 mg×1 瓶	-20℃ 保存	临用前甩几下使粉末全部落入瓶底, 加入 8.8mL 的试剂一, 混匀溶解备用。
试剂三	粉体 mg×1 瓶	4℃ 保存	临用前甩几下使粉末全部落入瓶底, 加入 8.8mL 的试剂一, 混匀溶解备用。
标准品	粉体 mg×1 支	4℃ 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL玻璃比色皿(光径1cm)、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、乙醇、冰和蒸馏水。

四、γ-谷氨酰转移酶(γ-GT):

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织(水分充足的样本可取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。4℃×12000rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量(g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞(冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量(10⁴): 提取液(mL)为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 410nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温(25℃)。

③ 在 1mL 玻璃比色皿中依次加入:

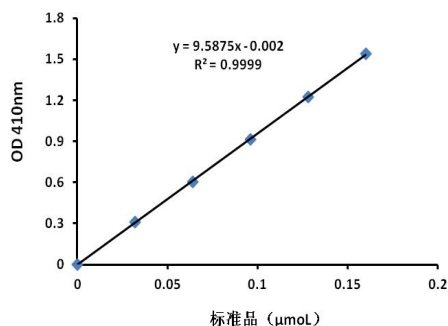
试剂名称(μL)	测定管
试剂一	320
样本	160

试剂二	160
试剂三	160
混匀后立即于 410nm 处读取 A1 值, 37℃ 准确反应 20min 后读取 A2。△A=A2-A1。	

【注】1. 若△A 小于 0.005, 可增大样本量 V1 (如增至 320μL, 试剂一相应减少), 则改变后的 V1 需代入公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线: $y=9.5875x - 0.002$: x 为标准品(μmol), y 为△A。



2、按样本鲜重计算:

单位定义: 在 37℃, 每克组织每分钟催化产生 1nmol 对硝基苯胺为一个酶活单位 (U)。

$$\begin{aligned} \gamma\text{-谷氨酰转移酶}(\gamma\text{-GT}) (\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.002) \div 9.5875] \times 10^3 \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 32.6 \times (\Delta A + 0.002) \div W \end{aligned}$$

3、按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 在 37℃, 每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1nmol 对硝基苯胺为一个酶活单位 (U)。

$$\begin{aligned} \gamma\text{-谷氨酰转移酶}(\gamma\text{-GT}) (\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.002) \div 9.5875] \times 10^3 \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 32.6 \times (\Delta A + 0.002) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算:

酶活定义: 在 37℃, 每 10⁴ 个细胞每分钟催化产生 1nmol 对硝基苯胺为一个酶活单位 (U)。

$$\begin{aligned} \gamma\text{-谷氨酰转移酶}(\gamma\text{-GT}) (\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.002) \div 9.5875] \times 10^3 \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 0.07 \times (\Delta A + 0.002) \end{aligned}$$

5、按照液体体积计算:

单位定义: 在 37℃, 每毫升液体每分钟催化产生 1nmol 对硝基苯胺为一个酶活单位 (U)。

$$\gamma\text{-谷氨酰转移酶}(\gamma\text{-GT}) (\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.002) \div 9.5875] \times 10^3 \div V1 \div T = 32.6 \times (\Delta A + 0.002)$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.16mL;

T---反应时间, 20min;

W---样本质量, g;

500---细胞数量

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (10μmol/mL): 临用前甩几下或离心, 使粉体落入底部, 加入 0.1mL 乙醇, 涡旋震荡溶解后再加入 0.9mL 的蒸馏水混匀, 得到 10μmol/mL 备用。
- 2 用蒸馏水把母液稀释成以下浓度: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1μmol/mL。也可根据实际来调整浓度。
- 3 160μL 标准品+640μL 试剂一, 混匀后于 410nm 处读取 A 值, 依据结果即可制作标准曲线。