

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

(货号: G0434W 微板法 96 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-甘氨酰甘氨酸, 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、试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 110mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉体 mg×1 瓶	-20°C保存	临用前甩几下使粉末全部落入底部, 加入 4.4mL 的试剂一, 混匀溶解备用。
试剂三	粉体 mg×1 支	4°C保存	临用前甩几下使粉末全部落入底部, 加入 4.4mL 的试剂一, 混匀溶解备用。
标准品	粉体 mg×1 支	4°C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、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, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。4°C×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°C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:

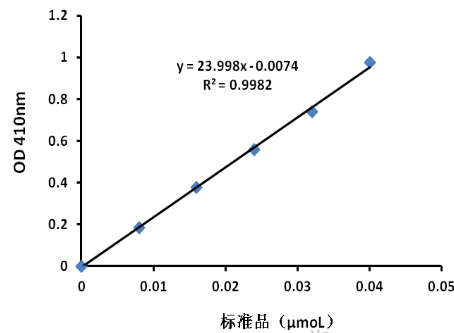
① 酶标仪预热 30 min 以上, 调节波长到 410nm。

② 所有试剂解冻至室温(25°C)。依次在 96 孔板中加入:

试剂名称 (μL)	测定管
试剂一	80
样本	40
试剂二	40
试剂三	40
混匀后立即于 410nm 处读取 A1 值, 37°C 准确反应 20min 后读取 A2。ΔA=A2-A1。	

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 23.998x - 0.0074$ ；x 为标准品(μmol)，y 为 ΔA 。



2、按样本鲜重计算：

单位定义：在 37°C ，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)。

$$\begin{aligned} \gamma\text{-谷氨酰转移酶}(\gamma\text{-GT}) (\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0074) \div 23.998] \times 10^3 \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 52.08 \times (\Delta A + 0.0074) \div W \end{aligned}$$

3、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：在 37°C ，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)。

$$\begin{aligned} \gamma\text{-谷氨酰转移酶}(\gamma\text{-GT}) (\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0074) \div 23.998] \times 10^3 \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 52.08 \times (\Delta A + 0.0074) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算：

单位定义：在 37°C ，每 10^4 个细胞每分钟催化产生 1nmol 对硝基苯胺为一个酶活单位 (U)。

$$\begin{aligned} \gamma\text{-谷氨酰转移酶}(\gamma\text{-GT}) (\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0074) \div 23.998] \times 10^3 \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 0.104 \times (\Delta A + 0.0074) \end{aligned}$$

5、按照液体体积计算：

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

$$\begin{aligned} \gamma\text{-谷氨酰转移酶}(\gamma\text{-GT}) (\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) &= [(\Delta A + 0.0074) \div 23.998] \times 10^3 \div V1 \div T \\ &= 52.08 \times (\Delta A + 0.0074) \end{aligned}$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.04mL；

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 ($50\mu\text{mol}/\text{mL}$)：临用前甩几下或离心，使粉体落入底部，加入 0.5mL 乙醇，涡旋震荡溶解后再加入 0.5mL 的蒸馏水混匀，得到 $50\mu\text{mol}/\text{mL}$ 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, $1\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。也可根据实际来调整浓度。
- 3 $40\mu\text{L}$ 标准品+ $160\mu\text{L}$ 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。