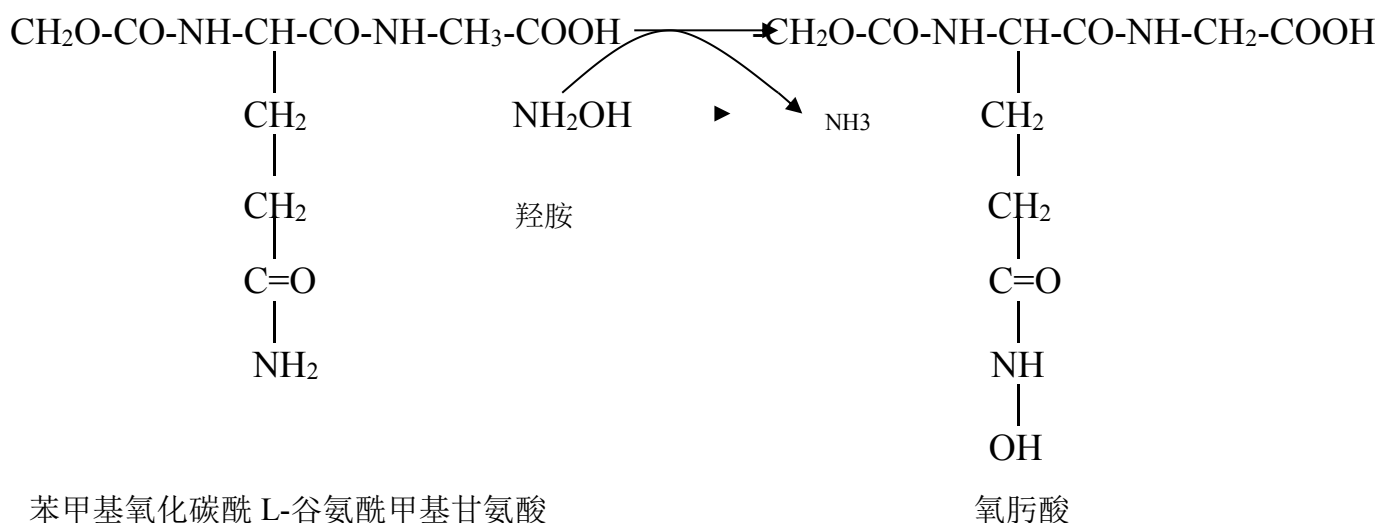


谷氨酰胺转氨酶(TG 酶)

(一) 原理

谷氨酰胺转氨酶的活性可以通过将伯胺羟基引入到合成基质 CBZ-Gly,然后测量生成的氧肟酸量的方法测定.氧肟酸的量则可通过测定它与 FeCl_3 -TCA 形成的红色络合物在 525nm 的吸光度而测得.

反应式:



(二) 试剂和溶液

A 试剂

1. 称取 9.688g 三羟甲基氨基甲烷(Tris),2.780g 盐酸羟氨 1.229g 还原型谷胱甘肽(GSH)4.048g 底物(Na-CBZ-GLY-GLY)于 400ml 烧杯中.
- 2.加 350ml 水,用磁力搅拌器混合 均匀.
- 3.用适当浓度的盐酸(通常 1 或 6mol/L)调节 pH 为 6.0.
- 4.将混合物移至 500ml 的容量瓶中加水定容至 500ml.

B 试剂

1.3N 盐酸(将 36%的 HCl 用水稀释 4 倍)

2.12%三氯乙酸(TCA) (称取 12.00g 的 TCA 于 100ml 的容量瓶中,加水定容至 100ml)

3. 5%FeCl₃ 溶于 0.1mol/LHCl 中(称取 5.00g FeCl₃·6H₂O 于 100ml 容量瓶中,加 0.1mol/L 的 HCl 溶解并定容至 100ml)

4.使用时再将三种溶液等量混合,并用磁力搅拌器混合均匀.

C 仪器

分光光度计

磁力搅拌器

恒温水浴锅

烧杯.三角瓶.试管等

D.标准曲线的作法

1.称取 64.8mg 的标准品 L-谷氨酸- γ -单异羟肟酸 (MW=162.1) 加 10ml0.2mol/L 的 Tri-HCl 缓冲液 (Ph6.0), 同试剂 A 但不加羟胺. GSH 和底物)

2.用 0.2mol/L 的 Tri-HCl 缓冲液通过 2 倍稀释法依次稀释 5 个梯度.

分别用移液管吸取 200 微升每种标准溶液于试管中, 37℃保温 1min.

4.准确加入已在 37℃预热 10min 的 A 试剂 2ml, 振荡混合器混合均匀.

5.再在 37℃保温 10min, 然后加入 2mlB 试剂, 振荡混合器混合均匀.

6.3000rpm 离心 10min 分离不溶物.

7.在加入 B 试剂 30 分钟后在 525nm 下测定上清液的吸光度.

8.以吸光度比氧肟酸的量做直线, 由直线的低斜率得到一个转换系数 K, 在样品酶活的测定中得到吸光度后就可以通过 K 计算出氧肟酸的生成量.

E. 样品酶活的测定

1.称取 100mg 待测样品于 50ml 烧杯中, 加入约 45ml0.2mol/L 的 Tri-HCl 缓冲液 (Ph6.0).

2. 室温下用磁力搅拌器搅拌 30min.
3. 移至 50ml 容量瓶中用 0.2mol/L 的 Tri-HCl 缓冲液定容至刻度, 作为待测样品.
4. 准确吸取 200 微升待测未知样品于试管中, 37°C 保温 min.
5. 准确加入已在 37°C 预热 10min 的 A 试剂 2ml, 振荡混合器混合均匀.
6. 再在 37°C 下保温 10min, 然后加入 2mlB 试剂, 振荡混合器混合均匀.
7. 3000rpm 离心 10min 分离不溶物.
8. 在加入 B 试剂 30 分钟后在 525nm 下测定上清液的吸光度 (At).

空白对照

1. 于待测样品中吸取 200 微升于试管中, 37°C 下保温 1min.
2. 加入 2mlB 试剂, 振荡混合器混合均匀.
3. 37°C 下保温 10min, 然后加入已在 37°C 预热 10min 的 A 试剂 2ml, 振荡混合器混合均匀, 3000rpm 离心 10min 分离不溶物.
4. 在加入 B 试剂 30 分钟后在 525nm 下测定上清液的吸光度 (Ab).

F 计算

酶活力定义: 一个单位的酶活力定义为每分钟催化 1 微 mol 底物形成产物的酶量.

1U=1 微 mol 产物(或底物)/min

$$\text{TG 酶活 (U/g)} = K \times (A_t - A_b) \times 1/S \times 1/10$$

式中: K ————— 转换系数

S ————— 测定样品的重量

10 ————— 反应时间 (min)

允许差

本方法平行测定的允许误差 ±1% 以内.