



γ -谷氨酰转肽酶(γ -GT)活性检测试剂盒(微量法)

货号: R41769

规格: 100T

有效期: 6个月

产品组成及保存条件:

名称	规格	储存条件
R41769-A	100mL×1瓶	4℃保存
R41769-B	粉剂×1瓶	4℃保存
R41769-C	4 ml×1瓶	4℃保存
R41769-D	15mL×1瓶	4℃保存
工作液(在R41769-B瓶中配制):临用前配制, 把R41769-C倒入R41769-B瓶中, 充分溶解(室温过低时可以40℃水浴促进溶解);然后把R41769-D倒入R41769-B瓶中, 混匀后室温保存。		

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介

意义: γ -谷氨酰转肽酶 (γ -glutamyl transpeptidase, 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。

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。

自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅、可调节移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水



粗酶液提取:

1. 组织: 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL R41769-A 进行冰浴匀浆; 8000g, 4℃ 离心 15min, 取上清, 置冰上待测。
2. 细菌或细胞: 500 万细胞加入 1mL R41769-A, 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℃, 离心 15min, 取上清置于冰上待测。
3. 血清等液体: 直接测定。

测定步骤:

1. 分光光度计预热 30min, 调节波长到 405 nm, 蒸馏水调零。
2. 工作液置于 25℃ (一般物种) 或者 37℃ (哺乳动物) 水浴中预热 30min (保证无沉淀)。
3. 样本测定, 按下表依次加入:

试剂名称	测定管(ul)	空白管(ul)
粗酶上清液	20	
蒸馏水		20
工作液	180	180
混匀后于 405nm 测定 10 s 和 130 s 时吸光度, 记为 A1 和 A2, 计算 ΔA 测定管=A 测 2-测 A1, ΔA 空白管=A 空 2- A 空 1, 计算 $\Delta A = \Delta A$ 测定管- ΔA 空白管		

注意: 空白管只需测定一次。

γ -GT 活性计算公式:

a. 按微量玻璃比色皿计算:

(1) 按蛋白浓度计算

活性单位定义: 25℃ 或者 37℃ 中, 每毫克蛋白每分钟催化产生 1 μ mol 对硝基苯胺为 1 个酶活单位。

$$\gamma\text{-GT (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V \text{ 反总} \div (C_{pr} \times V \text{ 样}) \div T = 0.506 \times \Delta A \div C_{pr}$$

(2) 按样本质量计算



活性单位定义: 25℃或者 37℃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。

$$\gamma\text{-GT (U/g)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V_{\text{反总}} \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 0.506 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义: 25℃或者 37℃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。

$$\gamma\text{-GT (U/10}^4\text{ cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}}) \div T = 0.001 \times \Delta A$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义: 25℃或者 37℃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。

$$\gamma\text{-GT (U/mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 0.506 \times \Delta A$$

注: V 样: 加入样本体积, 0.02mL; V 提取: 加入提取液体积: 1mL; T: 反应时间, 2min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞数量, 500 万细胞; ε: 对硝基苯胺消光系数, 9870L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 反总: 反应体系总体积, 2×10⁻⁴ L; 10⁶: 单位换算系数, 1mol=10⁶μmol。

b. 按 96 孔板计算:

(1) 按蛋白浓度计算

活性单位定义: 25℃或者 37℃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。

$$\gamma\text{-GT (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V_{\text{反总}} \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T = 1.01 \times \Delta A \div Cpr$$

(2) 按样本质量计算

活性单位定义: 25℃或者 37℃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。

$$\gamma\text{-GT (U/g)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V_{\text{反总}} \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 1.01 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义: 25℃或者 37℃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。

$$\gamma\text{-GT (U/10}^4\text{ cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}}) \div T = 0.002 \times \Delta A$$



(4) 按液体体积计算

活性单位定义: 25℃或者 37℃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。

$$\gamma\text{-GT (U/mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 1.01 \times \Delta A$$

注: V 样: 加入样本体积, 0.02mL; V 提取: 加入提取液体积: 1mL; T: 反应时间, 2min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞数量, 500 万细胞; ϵ : 对硝基苯胺消光系数, 9870L/mol/cm; d: 比色皿光径, 0.5cm; V 反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; 10^6 : 单位换算系数, 1mol=10⁶μmol。

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R41769-A 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. 配制好的工作液 2 周内使用完毕。