

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

(货号: ADS-W-G009 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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、试剂盒组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 110mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉体 1 瓶	-20℃避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 4.4mL 的试剂一, 混匀溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	粉体 1 瓶	4℃避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 4.4mL 的试剂一, 混匀溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	粉体 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、乙醇、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

- 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℃×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、检测步骤:

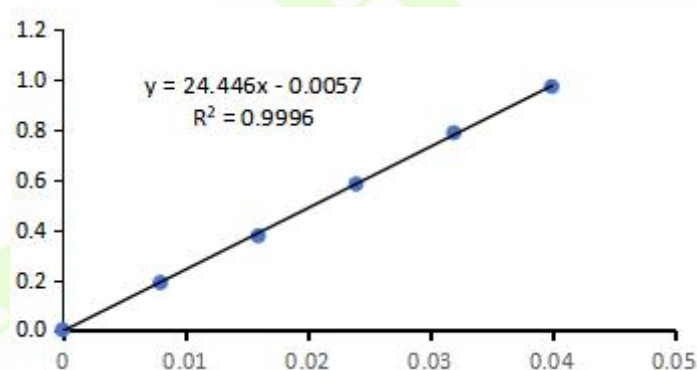
- ① 酶标仪预热 30 min 以上, 调节波长到 410nm。
- ② 所有试剂解冻至室温 (25℃)。依次在 96 孔板中加入:

试剂组分 (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℃准确反应 20min 后读取 A2。ΔA=A2-A1。	

【注】若ΔA 小于 0.005, 可增大样本量 V1 (如增至 80μL, 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: $y = 24.446x - 0.0057$: x 为标准品(μmol/L), y 为ΔA。



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)。

$$\begin{aligned} \gamma\text{-谷氨酰转移酶}(\gamma\text{-GT}) (\text{nmol/min/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0057) \div 24.446] \times 10^3 \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 51.1 \times (\Delta A + 0.0057) \div W \end{aligned}$$

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)。

$$\begin{aligned} \gamma\text{-谷氨酰转移酶}(\gamma\text{-GT}) (\text{nmol/min/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0057) \div 24.446] \times 10^3 \div (V1 \times Cpr) \div T \\ &= 51.1 \times (\Delta A + 0.0057) \div Cpr \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算:

单位定义: 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)。

$$\begin{aligned} \gamma\text{-谷氨酰转移酶}(\gamma\text{-GT}) (\text{nmol/min/10}^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0057) \div 24.446] \times 10^3 \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 0.102 \times (\Delta A + 0.0057) \end{aligned}$$

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)。

$$\begin{aligned} \gamma\text{-谷氨酰转移酶}(\gamma\text{-GT}) (\text{nmol/min/mL}) &= [(\Delta A + 0.0057) \div 24.446] \times 10^3 \div V1 \div T \\ &= 51.1 \times (\Delta A + 0.0057) \end{aligned}$$

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 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, 标准品母液浓度为 50 μ mol/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 μ mol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

- 2 标品稀释参照表如下:

吸取标准品母液 20uL, 加入 980uL 蒸馏水, 混匀得到 1 μ mol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μ mol/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据加样表操作, 根据结果, 以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值, 过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μ L)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	40	
蒸馏水		40
试剂一	160	160
混匀后于 410nm 处读取 A 值, $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		