

γ-谷氨酰转肽酶(γ-GT)活性检测试剂盒 γ-glutamyl transpeptidase Assay Kit

微量法

货号: AK049

规格: 100T / 96S

产品组成及保存条件:

名称	规格	储存条件
AK049-A	100mL×1 瓶	4℃保存
AK049-B	粉剂×1 瓶	4℃保存
AK049-C	4 ml×1 瓶	4℃保存
AK049-D	15mL×1 瓶	4℃保存
工作液 (在 AK049-B 瓶中配制): 临用前配制, 把 AK049-C 倒入 AK049-B 瓶中, 充分溶解 (室温过低时可以 40℃水浴促进溶解); 然后把 AK049-D 倒入 AK049-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 AK049-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 AK049-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		

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 1μmol 对硝基苯胺为 1 个酶活单位。

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

(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。

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

(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。

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

(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；10⁶：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 AKO49-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。