

γ -谷氨酰转肽酶 (γ -GT) 试剂盒说明书

微量法 100T/96S

注 意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

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。

测定原理：

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。

自备仪器和用品：

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

试剂组成和配制：

试剂一：液体 100mL×1 瓶，4℃保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃保存。

试剂三：液体 4mL×1 瓶，4℃保存。

试剂四：液体 14.8mL×1 瓶，4℃保存。

工作液（在试剂二瓶中配制）：临用前配制，把试剂三倒入试剂二瓶中，充分溶解（室温过低时可以 40℃ 水浴促进溶解）；然后把试剂四倒入试剂二瓶中，混匀后室温保存。

粗酶液提取：

1. 组织：按照组织质量（g）：试剂一体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一）进行冰浴匀浆。8000g，4℃离心 15min，取上清，置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量（ 10^4 个）：试剂一体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一），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。

γ-GT 测定操作:

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min, 调节波长到 405 nm, 蒸馏水调零。
2. 试剂二置于 25°C (一般物种) 或者 37°C (哺乳动物) 水浴中预热 30min (保证无沉淀)。
3. **测定管:** 取微量玻璃比色皿或 96 孔板, 依次加入 20μL 上清液, 180μL 工作液, 混匀后于 405nm 测定 10s 和 70s 时吸光度, 记为 A1 和 A2。

γ-GT 活性计算:

标准曲线: $y=0.006x+0.0016$, x 为对硝基苯胺浓度, y 为吸光值, $R^2=0.999$ 。

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1). 按蛋白浓度计算

活性单位定义: 25°C 或者 37°C 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。

$$\begin{aligned}\gamma\text{-GT } (\mu\text{mol/min/mg prot}) &= [(A2-A1)-0.0016] \div 0.006 \times V_{\text{反总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 1.67 \times [(A2-A1)-0.0016] \div C_{\text{pr}}\end{aligned}$$

(2). 按样本质量计算

活性单位定义: 25°C 或者 37°C 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。

$$\begin{aligned}\gamma\text{-GT } (\mu\text{mol/min/g 鲜重}) &= [(A2-A1)-0.0016] \div 0.006 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 1.67 \times [(A2-A1)-0.0016] \div W\end{aligned}$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义: 25°C 或者 37°C 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。

$$\begin{aligned}\gamma\text{-GT } (\mu\text{mol/min}/10^4 \text{ cell}) &= [(A2-A1)-0.0016] \div 0.006 \times V_{\text{反总}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 1.67 \times [(A2-A1)-0.0016] \div \text{细胞数量}\end{aligned}$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义: 25°C 或者 37°C 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。

$$\begin{aligned}\gamma\text{-GT } (\mu\text{mol/min/mL}) &= [(A2-A1)-0.0016] \div 0.006 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 1.67 \times [(A2-A1)-0.0016]\end{aligned}$$

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积 (L), 200μL=2×10⁻⁴L; C_{pr} : 蛋白浓度 (mg/mL); W : 样品质量; $V_{\text{样}}$: 反应体系中加入上清液体积 (mL), 20μL=0.02 mL; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1 mL; T : 反应时间 (min), 1min。

b.使用 96 孔板测定的计算公式如下

标准曲线: $y=0.003x+0.0016$, x 为对硝基苯胺浓度, y 为吸光值, $R^2=0.999$ 。

(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。

$$\begin{aligned}\gamma\text{-GT} (\mu\text{mol/min/mg prot}) &= [(A2-A1)-0.0016] \div 0.003 \times V_{\text{反总}} \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 3.34 \times [(A2-A1)-0.0016] \div Cpr\end{aligned}$$

(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 1 μ mol 对硝基苯胺为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned}\gamma\text{-GT} (\mu\text{mol/min/g 鲜重}) &= [(A2-A1)-0.0016] \div 0.003 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 3.34 \times [(A2-A1)-0.0016] \div W\end{aligned}$$

(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 1 μ mol 对硝基苯胺为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned}\gamma\text{-GT} (\mu\text{mol/min}/10^4 \text{ cell}) &= [(A2-A1)-0.0016] \div 0.003 \times V_{\text{反总}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 3.34 \times [(A2-A1)-0.0016] \div \text{细胞数量}\end{aligned}$$

(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 1 μ mol 对硝基苯胺为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned}\gamma\text{-GT} (\mu\text{mol/min/mL}) &= [(A2-A1)-0.0016] \div 0.003 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 3.34 \times [(A2-A1)-0.0016]\end{aligned}$$

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积 (L), 200 μ L=2 $\times 10^{-4}$ L; Cpr : 蛋白浓度 (mg/mL); W : 样品质量, g; $V_{\text{样}}$: 反应体系中加入上清液体积 (mL), 20 μ L=0.02 mL; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1 mL; T : 反应时间 (min), 1min。

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 的提取时可加试剂一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. 配置好的工作液 2 周内使用完毕。