

γ -谷氨酰转肽酶 (γ -glutamyltranspeptidase, γ -GT) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

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：

可见分光光度计、低温离心机、水浴锅、可调节移液器、1mL 玻璃比色皿和蒸馏水

试剂组成和配制：

试剂一：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：液体 10mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂四：液体 37mL×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. 分光光度计预热 30min，调节波长到 405 nm，蒸馏水调零。
2. 试剂二置于 25℃（一般物种）或者 37℃（哺乳动物）水浴中预热 30min（保证无沉淀）。
3. 测定管：取 1mL 玻璃比色皿，依次加入 100 μ L 上清液，900 μ L 工作液，混匀后于 405nm 测定 10 s 和 70 s 时吸光度，记为 A1 和 A2。

γ -GT 活性计算公式：

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

(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。

$$\begin{aligned}\gamma\text{-GT} (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(A_2 - A_1) - 0.0016] \div 0.006 \times V_{\text{反总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 1.67 \times [(A_2 - A_1) - 0.0016] \div C_{\text{pr}}\end{aligned}$$

(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 1μmol 对硝基苯胺为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned}\gamma\text{-GT} (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(A_2 - A_1) - 0.0016] \div 0.006 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 1.67 \times [(A_2 - A_1) - 0.0016] \div W\end{aligned}$$

(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 1μmol 对硝基苯胺为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned}\gamma\text{-GT} (\mu\text{mol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [(A_2 - A_1) - 0.0016] \div 0.006 \times V_{\text{反总}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 1.67 \times [(A_2 - A_1) - 0.0016] \div \text{细胞数量}\end{aligned}$$

(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 1μmol 对硝基苯胺为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned}\gamma\text{-GT} (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) &= [(A_2 - A_1) - 0.0016] \div 0.006 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 1.67 \times [(A_2 - A_1) - 0.0016]\end{aligned}$$

V 反总：反应体系总体积 (L)，1000μL=0.001 L；C_{pr}：蛋白浓度 (mg/mL)；V 样：反应体系中加入上清液体积 (mL)，100μL=0.1 mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；W，样本质量，g；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。