

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

(货号: BP10379F 分光法 48 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, 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、测试盒组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 40mL×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 8.8mL 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 8.8mL 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℃避光保存	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)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、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(水分充足的样本可取 0.5g), 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：

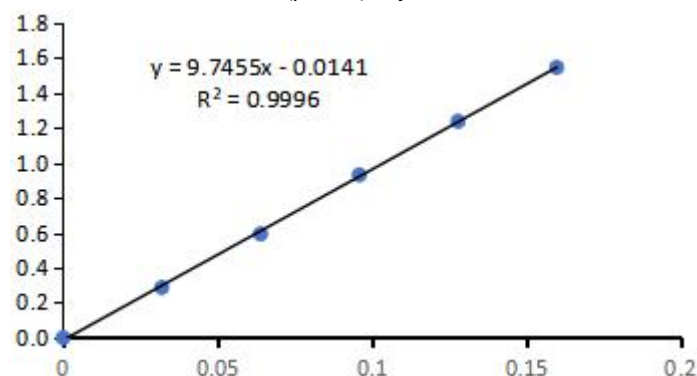
- ① 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 410nm，蒸馏水调零。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃）。
- ③ 在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管
试剂一	320
样本	160
试剂二	160
试剂三	160
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】1. 若ΔA 小于 0.005，可增大样本量 V1（如增至 320μL，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=9.7455x - 0.0141：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）。

$$\gamma\text{-谷氨酰转移酶}(\gamma\text{-GT}) (\text{nmol/min/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0141) \div 9.7455] \times 10^3 \div (W \times V1 \div V) \div T \\ = 32.1 \times (\Delta A + 0.0141) \div W$$

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）。

$$\gamma\text{-谷氨酰转移酶}(\gamma\text{-GT}) (\text{nmol/min/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0141) \div 9.7455] \times 10^3 \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ = 32.1 \times (\Delta A + 0.0141) \div \text{Cpr}$$

4、按细胞数量计算：

酶活定义：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）。

$$\gamma\text{-谷氨酰转移酶}(\gamma\text{-GT}) (\text{nmol/min/10}^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0141) \div 9.7455] \times 10^3 \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ = 0.06 \times (\Delta A + 0.0141)$$

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 对硝基苯胺为一个酶活单位（U）。

$$\gamma\text{-谷氨酰转移酶}(\gamma\text{-GT}) (\text{nmol/min/mL}) = [(\Delta A + 0.0141) \div 9.7455] \times 10^3 \div V1 \div T = 32.1 \times (\Delta A + 0.0141)$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.16mL；

T---反应时间，20min；

W---样本质量，g；

500---细胞数量，万；

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 20 μ L，加入 980 μ L 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	160	
蒸馏水		160
试剂一	640	640
混匀后于 410nm 处读取 A 值， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		