

γ-谷氨酰转肽酶 (γ-GT) 试剂盒说明书

分光光度法 50T/48S

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、1mL 玻璃比色皿、蒸馏水

试剂组成和配制：

试剂一：液体 60mL×1 瓶，4℃保存。

试剂二：液体 60mL×1 瓶，4℃保存。

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃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 (10⁴ 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. 工作液配制：临用前将试剂三转移至试剂二瓶内，充分震荡溶解。如有少量未溶解的沉淀，取上层清液使用。用不完的试剂-20℃保存。
3. 在 1mL 玻璃比色皿中依次加入 100μL 上清液，900μL 工作液，立即混匀后于 37℃测定 405nm 下 3min 和 13min 时吸光度，记为 A1 和 A2。ΔA=A2-A1。

γ-GT 活性计算：

(1). 按蛋白浓度计算

活性单位定义：37℃时每毫克蛋白每分钟催化产生 1nmol 对硝基苯胺为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned}\gamma\text{-GT (nmol/min/mg prot)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 411.5 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \\ &= 101.3 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}\end{aligned}$$

(2). 按样本质量计算

活性单位定义：37℃时每克样本每分钟催化产生 1nmol 对硝基苯胺为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned}\gamma\text{-GT (nmol/min/g 鲜重)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 101.3 \times \Delta A \div W\end{aligned}$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：37℃时每 10^4 个细胞每分钟催化产生 1nmol 对硝基苯胺为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned}\gamma\text{-GT (nmol/min/10}^4\text{ cell)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 101.3 \times \Delta A \div \text{细胞数量}\end{aligned}$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：37℃时每毫升液体每分钟催化产生 1nmol 对硝基苯胺为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned}\gamma\text{-GT (nmol/min/mL)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 101.3 \times \Delta A\end{aligned}$$

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 1×10^{-3} L; ϵ : 对硝基苯胺摩尔消光系数, 9.87×10^3 L / mol / cm; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.1 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 mL; T : 反应时间, 10min; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量, g。

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。