

谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 检测试剂盒说明书

微量法

AM0271

保存条件

按照产品内容保存要求保存。

产品信息

产品名称	产品货号	规格
谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 检测试剂盒 微量法	AM0271	100 管/96 样

产品简介

测定意义:

GST 是一种具有多种生理功能的蛋白质家族，主要存在于细胞质内。GST 是体内解毒酶系统的重要组成部分，主要催化各种化学物质及其代谢产物与 GSH 的巯基共价结合，使亲电化合物变为亲水物质，易于从胆汁或尿液中排泄，达到将体内各种潜在或具备毒性的物质降解并排出体外的目的。因此，GST 在保护细胞免受亲电子化合物的损伤中发挥着重要的生物学功能。此外，因为 GST 具有 GSH-Px 活性，亦称为 non-Se GSH-Px，具有修复氧化破坏的大分子如 DNA、蛋白质等的功能。注意，GST 催化的反应减少 GSH 含量，但是不增加 GSSG 含量。

测定原理:

GST 催化 GSH 与 CDNB 结合，其结合产物的光吸收峰波长为 340nm；通过测定 340nm 波长处吸光度上升速率，即可计算出 GST 活性。

产品内容

组成	含量	保存
试剂一	液体 x1 瓶	4°C
试剂二	液体 x1 瓶	4°C
试剂三	粉剂 x1 瓶	4°C 临用前加 2 mL 蒸馏水溶解

使用方法

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

需自备的仪器和用品：低温离心机、水浴锅、可调节移液器、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、和蒸馏水。

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 10min，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 10min，取上清置于冰上待测。
3. 血清等液体：直接测定。

4. 测定步骤：

1. 分光光度计/酶标仪预热 30 min，调节波长到 340 nm，用蒸馏水调零。
2. 试剂三放在 25℃（一般物种）或者 37℃（哺乳动物）保温。
3. 空白管：取微量石英比色皿或 96 孔板，加入 20μL 试剂一，180μL 试剂二和 20μL 试剂三，迅速混匀后于 340nm 测定吸光度变化，记录 10 s 和 310 s 吸光度为 A1 和 A2。
4. 测定管：取微量石英比色皿或 96 孔板，加入 20μL 上清液，180μL 试剂二和 20μL 试剂三，迅速混匀后于 340nm 测定吸光度变化，记录 10 s 和 310 s 吸光度为 A3 和 A4。

注意：空白管只需测定一次。

GST 活性计算公式：

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：在 25℃或者 37℃中，每毫克蛋白每分钟催化 1nmol/L CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

$$\text{GST (nmol/min/mg prot)} = [(A4 - A3) - (A2 - A1)] \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div (C_{\text{pr}} \times V \text{ 样}) \div T = 230 \times [(A4 - A3) - (A2 - A1)] \div C_{\text{pr}}$$

(2). 按样本质量计算

活性单位定义：在 25°C 或者 37°C 中，每克样品每分钟催化 1nmol/L CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

$$\text{GST (nmol/min/g)} = [(A4 - A3) - (A2 - A1)] \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 230 \times [(A4 - A3) - (A2 - A1)] \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：在 25°C 或者 37°C 中，每 10⁴ 个细胞每分钟催化 1nmol/L CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

$$\text{GST (nmol/min/10}^4\text{cell)} = [(A4 - A3) - (A2 - A1)] \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 230 \times [(A4 - A3) - (A2 - A1)] \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：在 25°C 或者 37°C 中，每毫升液体每分钟催化 1nmol/L CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{GST (nmol/min/mL)} &= [(A4 - A3) - (A2 - A1)] \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div V \text{ 样} \div T \\ &= 230 \times [(A4 - A3) - (A2 - A1)] \end{aligned}$$

ϵ : 产物摩尔消光系数, 9.6×10³L/mol /cm; d: 比色皿光径, 1cm; 10⁶: 1mol=1×10⁶μmol; V 反总: 反应体系总体积, 220μL=2.2×10⁻⁴L; Cpr: 上清液蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定; W : 样品质量; V 样: 加入反应体系中上清液体积, 20μL=0.02 mL; V 样总: 提取液体积, 1 mL; T: 反应时间 (min), 5min。

b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下

(1). 按蛋白浓度计算

活性单位定义：在 25°C 或者 37°C 中，每毫克蛋白每分钟催化 1nmol/L CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

$$\text{GST (nmol/min/mg prot)} = [(A4 - A3) - (A2 - A1)] \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T = 460 \times [(A4 - A3) - (A2 - A1)] \div Cpr$$

(2). 按样本质量计算

活性单位定义：在 25°C 或者 37°C 中，每克样品每分钟催化 1nmol/L CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

$$\text{GST (nmol/min/g)} = [(A4 - A3) - (A2 - A1)] \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T$$

$$\text{总} \div T = 460 \times [(A4 - A3) - (A2 - A1)] \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：在 25°C 或者 37°C 中，每 10⁴ 个细胞每分钟催化 1nmol/L CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

$$\text{GST (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(A4 - A3) - (A2 - A1)] \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 460 \times [(A4 - A3) - (A2 - A1)] \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：在 25°C 或者 37°C 中，每毫升液体每分钟催化 1nmol/L CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

$$\text{GST (nmol/min/mL)} = [(A4 - A3) - (A2 - A1)] \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div V \text{ 样} \div T \\ = 460 \times [(A4 - A3) - (A2 - A1)]$$

ϵ : 产物摩尔消光系数, 9.6×10³L/mol/cm; d: 96 孔板光径, 0.5cm; 10⁶: 1mol=1×10⁶μmol; V 反总: 反应体系总体积, 220μL=2.2×10⁻⁴L; Cpr: 上清液蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定; W : 样品质量; V 样: 加入反应体系中上清液体积, 20μL=0.02 mL; V 样总: 提取液体积, 1 mL; T: 反应时间 (min), 5min。

注意事项

1. 样品处理等过程均需要在冰上进行，且须在当日测定酶活力；
2. 细胞中 GST 活性测定时，细胞数目须在 300 万-500 万之间，细胞中 GST 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；
3. 本法测定 GST 活性的线性范围可达 76 μmol/min /L，测定前先用 1~2 个样做预实验，如 5min 内反应不成线性，须对样品用蒸馏水稀释，计算结果乘以稀释倍数；
4. 测定反映的温度对测定结果有影响，请控制在 25°C 或者 37°C（哺乳动物）。