

组织及血液谷胱甘肽 S-转移酶（GST）活性

检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AMHB8-C48	组织及血液谷胱甘肽 S-转移酶（GST）检测试剂盒	48T	常量法

产品说明:

谷胱甘肽 S-转移酶（glutathione S-transferase, 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-SeGSH-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。

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，即可计算出活性。

试剂组成:

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂二	液体 55 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂三	粉剂×1瓶	2-8℃ 保存

溶液配制:

试剂三：临用前加6 mL 蒸馏水溶解，2-8℃保存4 周。

操作步骤:

一、样本处理

- 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。
- 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 10min，取上清置于冰上待测。
- 血清（血浆）等液体：直接测定。

二、测定步骤

1. 分光光度计预热 30 min 以上, 调节波长到 340 nm, 用蒸馏水调零。
2. 根据样本量取部分试剂二置于 37°C 预热 15min。
3. 操作表: (在 1mL 石英比色皿中加入下列试剂)

试剂名称 (μL)	测定管	空白管
试剂一	-	100
样本	100	
试剂二	900	900
试剂三	100	100

将上述试剂分别加入比色皿后迅速吹打混匀, 记录第 10s 的吸光值 A1 测定 (A1 空白), 迅速置于 37°C 水浴或培养箱 5min, 拿出迅速擦干测定 5min 10s 时的吸光值 A2 测定 (A2 空白), 计算 $\Delta A = (A2 \text{ 测定} - A1 \text{ 测定}) - (A2 \text{ 空白} - A1 \text{ 空白})$ 。

空白管只需做 1-2 次。

三、GST 活性计算

(1) 按蛋白浓度计算

活性单位定义: 在 37°C 条件下, 每毫克蛋白每分钟催化 1 μmol CDNB 与 GSH 结合为一个酶活性单位。GST 活性 (U/mg prot) = $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V \text{ 反总} \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T = 0.23 \times \Delta A \div Cpr$

(2) 按样本质量计算

活性单位定义: 在 37°C 条件下, 每克样本每分钟催化 1 μmol CDNB 与 GSH 结合为一个酶活性单位。GST 活性 (U/g 质量) = $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T = 0.23 \times \Delta A \div W$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义在 37°C 条件下, 每 10⁴ 个细胞每分钟催化 1 μmol CDNB 与 GSH 结合为一个酶活单位。GST 活性 (U/10⁴ cell) = $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V \text{ 反总} \div (N \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 0.23 \times \Delta A \div N$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义: 在 37°C 条件下, 每毫升液体每分钟催化 1 μmol CDNB 与 GSH 结合为一个酶活单位。GST 活性 (U/mL) = $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V \text{ 反总} \div V \text{ 样} \div T = 0.23 \times \Delta A$

ϵ : 产物摩尔消光系数, 9.6 × 10³ L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; 10⁶: 单位换算系数, 1mol = 1 × 10⁶ μmol; V 反总: 反应体系总体积, 1100 μL = 0.0011L; Cpr: 上清液蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定; V 样: 加入反应体系中上清液体积, 100 μL = 0.1mL; T: 反应时间, 5min; W: 样本质量, g; V 样总: 试剂一体积, 1 mL; 细胞数量: 以 10⁴ 为单位, 万; N: 细胞数量, 以万计。

注意事项:

1. 样本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. 若样本测定吸光度大于 1，建议将样本用蒸馏水稀释，计算时结果乘以稀释倍数；
 4. 测定反应的温度对测定结果有影响，请将反应温度控制在 37℃。