

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-M96	组织及血液谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 检测试剂盒	96T	微量法

产品说明：

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。

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 110 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂二	液体 22 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3 mL 蒸馏水溶解，2-8℃ 保存4 周。

操作步骤：

一、样本处理

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（血浆）等液体：直接测定。

二、测定步骤

1. 分光光度计/酶标仪预热 30 min 以上，调节波长到340nm，分光光度计用蒸馏水调零。

2. 根据样本量取部分试剂二置于 37℃ 预热 15min。

3. 操作表：（在微量石英比色皿或96孔UV板中加入下列试剂）

试剂名称(μL)	测定管	空白管
试剂一	-	20
样本	20	-
试剂二	180	180
试剂三	20	20

将上述试剂分别加入微量比色皿或96UV孔板后迅速吹打混匀，记录第10s时340nm处的吸光值A1测定（A1空白），37℃水浴锅或者恒温培养箱反应5min（酶标仪有控温功能的可以调节温度至37℃），反应后拿出迅速擦干测定5min10s时吸光值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

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37℃条件下，每毫克蛋白每分钟催化1μmol 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℃条件下，每克样本每分钟催化1μmol 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℃条件下，每10⁴个细胞每分钟催化1μmol 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℃条件下，每毫升液体每分钟催化1μmol 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, 9.6×10³L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; 10⁶: 单位换算系数, 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: 样本质量, g; V样: 加入反应体系中上清液体积, 20μL=0.02mL; V样总: 试剂一体积, 1mL; T: 反应时间, 5min; N: 细胞数量, 以万计。

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 37℃ 条件下，每毫克蛋白每分钟催化 1 μ mol CDNB 与 GSH 结合为一个酶活性单位。 GST 活性 (U/mg prot) = $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V_{\text{反总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 0.38 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

2、按样本质量计算

活性单位定义：在 37℃ 条件下，每克样本每分钟催化 1 μ mol CDNB 与 GSH 结合为一个酶活性单位。 GST 活性 (U/g 质量) = $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 0.38 \times \Delta A \div W$

3、按细胞数量计算

活性单位定义：在 37℃ 条件下，每 10⁴ 个细胞每分钟催化 1 μ mol CDNB 与 GSH 结合为一个酶活单位。

GST 活性 (U/10⁴ cell) = $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V_{\text{反总}} \div (N \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.38 \times \Delta A \div N$

4、按液体体积计算

活性单位定义：在 37℃ 条件下，每毫升液体每分钟催化 1 μ mol CDNB 与 GSH 结合为一个酶活单位。 GST 活性 (U/mL) = $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 0.38 \times \Delta A$

ϵ : 产物摩尔消光系数, 9.6 $\times 10^3$ L/mol/cm; d: 96 孔板光径, 0.6cm; 10⁶: 单位换算系数, 1mol=1 $\times 10^6$ μ mol; V 反总: 反应体系总体积, 220 μ L=2.2 $\times 10^{-4}$ L; Cpr: 上清液蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定; W : 样本质量, g; V 样: 加入反应体系中上清液体积, 20 μ L=0.02mL; V 样总: 加入试剂一体积, 1 mL; T: 反应时间, 5min; 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，建议对样本用蒸馏水稀释，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℃。