

组织及血液谷草转氨酶（AST）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
AMHD2-C24	组织及血液谷草转氨酶（AST）试剂盒	24T	常量法

产品说明:

谷草转氨酶又叫天门冬氨酸氨基转移酶（2.6.1.1），广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，催化可逆转氨基反应，是氨基酸代谢的重要酶。此外，GOT在心肌细胞中含量最高，临床上一般常作为心肌梗塞和心肌炎的辅助检查。肝脏损害时其血清浓度也可升高。

GOT催化 α -酮戊二酸和天门冬氨酸发生转氨基反应，生成谷氨酸和草酰乙酸，草酰乙酸进一步自行脱羧生成丙酮酸；丙酮酸可与2,4-二硝基苯肼反应生成2,4-二硝基苯腙，在碱性条件下显棕红色；测定505nm吸光度的变化，即可计算GOT酶活性。

试剂组成:

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 30 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂一	粉剂×2 瓶	2-8℃ 保存
试剂二	液体 8 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂三	液体 80 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8℃ 保存

溶液的配制:

- 1、试剂一：临用前取一瓶加入4 mL 蒸馏水溶解，现用现配，2-8℃可保存4 周；该试剂为冻干试剂，可能存在肉眼观察试剂量相差较大甚至量很少的现象，此现象不影响使用，实际质量相同；
- 2、标准品：20 $\mu\text{mol/mL}$ 丙酮酸钠。

操作步骤:

一、样本处理

- 1、细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（ 10^6 个）：提取液体积（mL）为5~10：1 的比例（建议5 百万细菌或细胞加入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）；3500g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。
- 2、组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为1：5~10 的比例（建议称取约0.1g 组织，加入1mL 提取液），进行冰浴匀浆。3500g，4℃离心10min，取上清，置冰上待测。
- 3、血清（浆）样本：直接检测。若有浑浊离心取上清使用。

二、测定步骤

- 1、分光光度计预热30min以上，调节波长至505nm，蒸馏水调零。
- 2、标准曲线的稀释：将20 $\mu\text{mol/mL}$ 丙酮酸钠溶液用蒸馏水稀释至1、0.8、0.6、0.4、0.2、0.1、0.05、0 $\mu\text{mol/mL}$ （0即为空白管）。
- 3、标准品稀释表：

序号	稀释前浓度（ $\mu\text{mol/mL}$ ）	标准品体积（ μL ）	蒸馏水体积（ μL ）	稀释后浓度（ $\mu\text{mol/mL}$ ）
1	20	50	950	1

2	1	200	50	0.8
3	1	150	100	0.6
4	1	200	300	0.4
5	0.4	250	250	0.2
6	0.2	250	250	0.1
7	0.1	250	250	0.05
8 (空白管)	-	-	250	0

备注：实验中每个标准管需 120 μ L 标准品（注意不要在此步骤直接检测吸光值）。

4、在EP管中加入下列试剂

试剂名称 (μ L)	测定管	对照管	标准管
待测样本	20	-	-
试剂一	100	100	-
标准品	-	-	120
混匀后，37 $^{\circ}$ C 反应30min			
试剂二	100	100	100
待测样本	-	20	-
混匀后，37 $^{\circ}$ C 反应20min			
试剂三	1000	1000	1000
混匀，常温放置10min，吸取反应液于505nm波长处测定吸光度，记为A测定管、A对照管、A标准管和A空白管（即0 μ mol/mL标准点），计算 ΔA 标准= A标准管-A空白管， ΔA = A测定管-A对照管。标准曲线只需做1-2次。			

三、GOT 活性计算

1. 标准曲线的绘制：以各标准品浓度为x轴，以 ΔA 标准为y轴做标准曲线，得到方程 $y=kx+b$ 。将 ΔA 带入方程求x 值 (μ mol/mL)。

2. GOT活性计算：

(1) 按样本质量计算：

单位定义：每小时每g样本催化产生1 μ mol丙酮酸的量为一个GOT活性单位。

$$\text{GOT活性 (U/g 质量)} = x \times (V_{\text{样本}} + V_{\text{试剂一}}) \div (W \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times F = 12x \div W \times F$$

(2) 按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每小时每mg组织蛋白催化产生1 μ mol丙酮酸的量为一个GOT活性单位。

$$\text{GOT活性 (U/mg prot)} = x \times (V_{\text{样本}} + V_{\text{试剂一}}) \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样本}}) \div T \times F = 12x \div C_{\text{pr}} \times F$$

3) 按血清体积计算：

单位定义：每小时每mL血清样本催化产生1 μ mol丙酮酸的量为一个GOT活性单位。

$$\text{GOT活性 (U/mL)} = x \times (V_{\text{样本}} + V_{\text{试剂一}}) \div V_{\text{样本}} \div T \times F = 12x \times F$$

(4) 按细菌或细胞数量计算：

单位定义：每小时每 10^6 细菌或细胞催化产生1 μ mol丙酮酸的量为一个GOT活性单位。

$$\text{GOT活性 (U/10}^6 \text{ cell)} = x \times (V_{\text{样本}} + V_{\text{试剂一}}) \div (N \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times F = 12x \div N \times F$$

V 样本：吸取样本体积，0.02mL；V 试剂一：吸取试剂一体积，0.1mL；V 样总：吸取提取液体积，1mL；W： 样本质量，g；Cpr： 样本蛋白质浓度，mg/mL；T： 反应时间，0.5h；N： 细胞或细菌总数，以百万计；F： 样本 稀释倍数。