

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-M48	组织及血液谷草转氨酶（AST）试剂盒	48T	微量法

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60 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂一	粉剂×2 支	2-8℃ 保存
试剂二	液体3.5 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂三	液体30 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：提供 1 个 8 mL 空瓶；临用前取 1 支试剂一倒入空瓶中，用 2 mL 蒸馏水溶解，再用溶液将试剂一残留的试剂润洗下来，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 μ 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、分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至505nm，分光光度计蒸馏水调零。
- 2、标准曲线的稀释：将20 μmol/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 μmol/mL（0即为空白管）。
- 3、标准品稀释表：

序号	稀释前浓度(μmol/mL)	标准液体积(μL)	蒸馏水体积(μL)	稀释后浓度(μmol/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 30μL 标准品（注意不要在此步骤直接检测吸光值）。

- 4、在EP管或在96孔板中加入下列试剂

试剂名称(μL)	测定管	对照管	标准管
待测样本	5	-	-
试剂一	25	25	-
标准品	-	-	30
混匀后，37℃反应30min			
试剂二	25	25	25
待测样本	-	5	-
混匀后，37℃反应20min			
试剂三	240	240	240

混匀，常温放置10min，吸取200μL反应液于96孔板或微量比色皿中，测定505nm波长处的吸光度，记为A测定管、A对照管、A标准管和A空白管（即0μmol/mL标准点），计算 $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管}$ ， $\Delta A = A_{测定管} - A_{对照管}$ 。标准曲线只需做1-2次。

三、GOT 活性计算

- 1、标准曲线的绘制：

以各标准溶液浓度为x轴，以 $\Delta A_{标准}$ 为y轴做标准曲线，得到方程 $y=kx+b$ 。将 ΔA 带入方程求x值(μmol/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1μmol丙酮酸的量为一个GOT活性单位。

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

- (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。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(浆)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。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10⁶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。

GOT活性 (U/10⁶ 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，0.005mL；V试剂一：吸取试剂一体积，0.025mL；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。