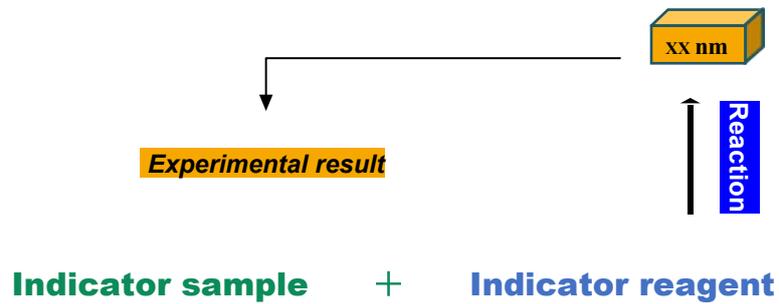


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

谷胱甘肽S-转移酶（GST）检测试剂盒说明书 微量法

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

产品内容：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂二	液体 22mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂三	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加 2 mL 蒸馏水溶解

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 GST 活性。

自备仪器和用品：

低温离心机、水浴锅、可调节移液器、紫外-可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板（ZC-1036: UV板）和蒸馏水。

操作步骤：

一、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

二、测定：

1. 分光光度计/酶标仪预热 30 min 以上，调节波长到 340 nm，用蒸馏水调零。
2. 试剂二放在 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，加入20 μL试剂一，180 μL试剂二和 20 μL试剂三，迅速混匀后于340nm 测定 10 s 吸光度记 A1，37℃水浴 5min 后，快速取出测定吸光度记 A2。
4. 测定管：取微量石英比色皿，加入20 μL上清液，180 μL试剂二和 20 μL试剂三，迅速混匀后于340nm 测定 10 s 吸光度记 A3，37℃水浴 5min后，快速取出测定吸光度记 A4。

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 25°C 或者 37°C 中，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。

$$\text{GST (U/mg prot)} = [(A4-A3) - (A2-A1)] \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V_{\text{反总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T$$

$$= 0.23 \times [(A4-A3) - (A2-A1)] \div C_{\text{pr}}$$

2. 按样本鲜重计算

活性单位定义：在 25°C 或者 37°C 中，每克样品每分钟催化 1 μmol CDNB 与 GSH 结合为一个酶活性单位。

$$\text{GST (U/g 鲜重)} = [(A4-A3) - (A2-A1)] \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T$$

$$= 0.23 \times [(A4-A3) - (A2-A1)] \div W$$

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 1 μmol CDNB 与 GSH 结合为一个酶活单位。

$$\text{GST (U/10}^4 \text{ cell)} = [(A4-A3) - (A2-A1)] \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 0.23 \times [(A4-A3) - (A2-A1)] \div 500$$

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 1 μmol CDNB 与 GSH 结合为一个酶活单位。

$$\text{GST (U/mL)} = [(A4-A3) - (A2-A1)] \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T$$

$$= 0.23 \times [(A4-A3) - (A2-A1)]$$

ϵ ：产物摩尔消光系数， $9.6 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； d ：比色皿光径，1cm； 10^6 ： $1\text{mol}=1 \times 10^6 \mu\text{mol}$ ； $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积， $220 \mu\text{L}=2.2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ； C_{pr} ：上清液蛋白质浓度 (mg/mL)，需要另外测定，建议选用本公司生产的 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒； W ：样品质量，g； $V_{\text{样}}$ ：加入反应体系中上清液体积， $20 \mu\text{L}=0.02 \text{ mL}$ ； $V_{\text{样总}}$ ：试剂一体积，1 mL； T ：反应时间 (min)，5min；500：细胞数量，500 万。

b.使用 96 孔板 (UV 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 1 μmol CDNB 与 GSH 结合为一个酶活性单位。

$$\text{GST (U/mg prot)} = [(A4-A3) - (A2-A1)] \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V_{\text{反总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T$$

$$= 0.38 \times [(A4-A3) - (A2-A1)] \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算

活性单位定义：在 25°C 或者 37°C 中，每克样品每分钟催化 1 μmol CDNB 与 GSH 结合为一个酶活性单位。

$$\text{GST (U/g 鲜重)} = [(A4-A3) - (A2-A1)] \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T$$

$$= 0.38 \times [(A4-A3) - (A2-A1)] \div W$$

(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 1 μmol CDNB 与 GSH 结合为一个酶活单位。

$$\text{GST (U/10}^4 \text{ cell)} = [(A4-A3) - (A2-A1)] \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 0.38 \times [(A4-A3) - (A2-A1)] \div 500$$

(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 1 μmol CDNB 与 GSH 结合为一个酶活单位。

$$\text{GST (U/mL)} = [(A4 - A3) - (A2 - A1)] \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \\ = 0.38 \times [(A4 - A3) - (A2 - A1)]$$

ϵ ：产物摩尔消光系数， $9.6 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； d ：96 孔板（UV 板）光径，0.6cm； 10^6 ： $1\text{mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$ ； $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积， $220 \mu\text{L} = 2.2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ； C_{pr} ：上清液蛋白质浓度（mg/mL），需要另外测定，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒（货号：ZC-S0470）； W ：样品质量； $V_{\text{样}}$ ：加入反应体系中上清液体积， $20 \mu\text{L} = 0.02 \text{ mL}$ ； $V_{\text{样总}}$ ：加入试剂一体积，1 mL； T ：反应时间（min），5min；500：细胞数量，500 万。

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. 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. 若样品测定吸光度大于 1，建议对样品用蒸馏水稀释，计算时结果乘以稀释倍数；
5. 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）。