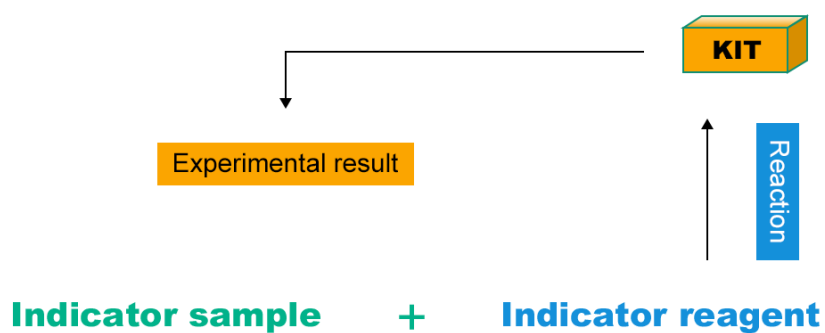


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0606

Size: 50T/48S

谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

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-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。

二、测定原理:

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。

三、需自备的仪器和用品:

紫外-可见分光光度计、低温离心机、水浴锅、可调节移液器、1mL 石英比色皿和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 45mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加 5 mL 蒸馏水溶解

五、操作步骤：

● 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（ 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。

3. 血清等液体：直接测定。

● 测定：

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. 试剂二、试剂三放在 25℃（一般物种）或者 37℃（哺乳动物）保温。
3. 空白管：取 1mL 石英比色皿，加入 100 μ L 试剂一，900 μ L 试剂二和 100 μ L 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。测定管：取 1mL 石英比色皿，加入 100 μ L 上清液，900 μ L 试剂二和 100 μ L 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。

六、GST 活性计算：

（1）按蛋白浓度计算

活性单位定义：在 25℃或者 37℃中，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。

$$\text{GST (U/mg prot)} = [(A4 - A3) - (A2 - A1)] \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V_{\text{反应}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T$$
$$= 0.23 \times [(A4 - A3) - (A2 - A1)] \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算

活性单位定义：在 25℃或者 37℃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℃或者 37℃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。

$$\text{GST (U/10}^4 \text{ cell)} = [(A4 - A3) - (A2 - A1)] \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V_{\text{反总}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.23 \times [(A4 - A3) - (A2 - A1)] \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：在 25℃或者 37℃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，9.6×10³ L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；10⁶：1mol=1×10⁶ μmol；V_{反总}：反应体系总体积，1100 μL=0.0011 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 BCA 蛋白质含量测定试剂盒（货号：ZC-S0470）；V_样：加入反应体系中上清液体积，100 μL=0.1 mL；T：反应时间，5min；W：样品鲜重，g；V_{样总}：试剂一体积，1mL。

七、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℃或者 37℃（哺乳动物）