

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-S0652

Size: 50T/24S

谷草转氨酶 (GOT; AST) 检测试剂盒说明书

可见分光光度法

*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:

GOT (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。

二、测定原理:

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 酶活力。

三、需自备的仪器和用品:

可见分光光度计、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

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
提取液	液体 30mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂一	粉剂 × 1 瓶	4°C 保存	临用前每支用 8mL 蒸馏水溶解; 现用现配
试剂二	液体 8mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂三	液体 80 mL × 1 瓶	4°C 保存	
标准品	液体 1mL × 1 支	4°C 保存	20 μ mol/mL 丙酮酸钠标准品

五、操作步骤：

● 样品测定的准备

1. 细胞或微生物样品的制备：

先收集细胞或微生物样品到离心管内，弃上清，按照每 500 万细胞或微生物加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 20%，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）3500g，4°C 离心 10min，取上清，置冰上待测。

2. 组织：

称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液进冰浴行匀浆。3500g 4°C 离心 10min，取上清，置冰上待测。

3. 血清（浆）样品：直接检测。

● 测定操作表

1. 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 505nm，蒸馏水调零。

2. 标准曲线的测定

首先将标准品用蒸馏水稀释至 2 μ mol/mL，按下表 混合标准品和试剂一得到相应浓度度标准管：

标准品 (μ L)	试剂一 (μ L)	标准管浓度 (μ mol/mL)
120	0	2
90	30	1.5
60	60	1
45	75	0.8
24	96	0.4
12	108	0.2
6	114	0.1
3	117	0.05
0	120	0

3. 在 EP 管中加入下列试剂

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	标准管
待测样本	20		
试剂一	100	100	
标准液			120

混匀后, 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 预热 30min

试剂二	100	100	100
待测样本		20	

混匀后, 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 准确水浴 20min

试剂三	1000	1000	1000
-----	------	------	------

混匀, 室温放置 10min, 在 505nm 波长处, 测各管吸光度

注: 0μmol/mL 标准管为空白管。

六、计算

1、标准曲线的绘制:

以各标准溶液浓度为 x 轴, 以 ΔA (A 标准管 - A 空白管) 为 y 轴做标准曲线, 得到方程 $y=kx+b$ 。
将 (A 测定管 - A 对照管) 带入方程求 x 值。

2、GOT 活性计算:

(1) 按样本鲜重计算:

单位定义: 每小时每 g 鲜重样品催化产生 1μmol 丙酮酸的量为一个 GOT 活力单位。

$GOT (U/g \text{ 鲜重}) = x \times (V \text{ 样本} + V \text{ 试剂一}) \div (W \times V \text{ 样本} \div V \text{ 样总}) \div T = 12x \div W$ 。

(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 $1\mu\text{mol}$ 丙酮酸的量为一个 GOT 活力单位。

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

(3) 按血清体积计算:

单位定义: 每小时每 mL 血清样品催化产生 $1\mu\text{mol}$ 丙酮酸的量为一个 GOT 活力单位。

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

(4) 按细胞数量计算:

单位定义: 每小时每 10^4 个细胞样品催化产生 $1\mu\text{mol}$ 丙酮酸的量为一个 GOT 活力单位。

$$\text{GOT (U}/10^4 \text{ cell)} = x \times (V_{\text{样本}} + V_{\text{试剂一}}) \div (V_{\text{样本}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 0.024x$$

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: 样本鲜重, g; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; T: 反应时间, 0.5h; 500: 细胞数量或微生物数量, 500 万。