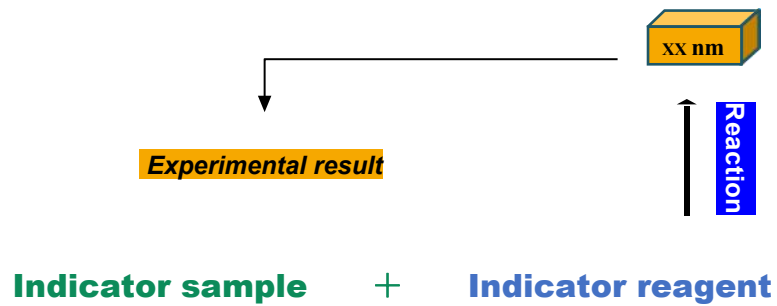


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



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 (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 (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。

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°C（一般物种）或者 37°C（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°C 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°C 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 结合为一个酶活性单位。

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

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

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 结合为一个酶活性单位。

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

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

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，220 μL = 2.2 × 10⁻⁴ 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_样：加入反应体系中上清液体积，20 μL = 0.02 mL；V_{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 × 10³ L/mol /cm；d：96 孔板（UV 板）光径，0.6cm；10⁶：1mol=1 × 10⁶ μmol；V 反总：反应体系总体积，220 μL=2.2 × 10⁻⁴ L；Cpr：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；V 样：加入反应体系中上清液体积，20 μL=0.02 mL；V 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）。