

谷胱甘肽 S-转移酶(GST)活性检测试剂盒说明书

Glutathione S-transferase Assay Kit

微量法

货号: AK089

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK089-A	100mL×1 瓶	4℃保存;
AK089-B	22mL×1 瓶	4℃保存;
AK089-C	粉剂×1 瓶	4℃保存; 临用前加 2 mL 蒸馏水溶解。 用前放在 25℃ (一般物种) 或者 37℃ (哺乳动物) 保温。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

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。

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。

自备用品:

紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板(UV 板)、水浴锅、可调式移液枪、研钵、冰和双蒸水。

粗酶液提取:

- 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 (10⁴ 个): AK089-A 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL AK089-A, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 300W, 超声 3s, 间隔 7s, 总时间 3min); 然后 8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
- 组织: 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK089-A, 进行冰浴匀浆。8000g, 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
- 血清 (浆) 样品: 直接检测。

测定步骤:

- 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- AK089-C 放在 25℃ (一般物种) 或者 37℃ (哺乳动物) 保温。
- 样本测定, 取微量石英比色皿或 96 孔板 (UV 板), 加入下列试剂:

试剂名称	测定管 (ul)	对照管 (ul)
AK089-A		20
AK089-B		180
AK089-C		20

迅速混匀后于 340nm 测定吸光度变化, 记录 10 s 和 310 s 吸光度为 A1 和 A2。

待测样本	20	
AK089-B	180	
AK089-C	20	

迅速混匀后于 340nm 测定吸光度变化, 记录 10 s 和 310 s 吸光度为 A3 和 A4。

注意: 空白管只需测定 1-2 次。

GST 酶活性计算:

a. 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℃或者 37℃中, 每毫克蛋白每分钟催化 1μmol CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

$$\text{计算公式: GST (U/mg prot)} = [(A4-A3)-(A2-A1)] \div \epsilon \div d \times 10^6 \times V \text{ 反总} \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T \\ = 0.23 \times [(A4-A3)-(A2-A1)] \div Cpr$$

2. 按样本质量计算

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

$$\text{计算公式: GST (U/g)} = [(A4-A3)-(A2-A1)] \div \epsilon \div d \times 10^6 \times V \text{ 反总} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 0.23 \times [(A4-A3)-(A2-A1)] \div W$$

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 1μmol CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

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

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 1μmol CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

$$\text{计算公式: GST (U/mL)} = [(A4-A3)-(A2-A1)] \div \epsilon \div d \times 10^6 \times V \text{ 反总} \div V \text{ 样} \div T \\ = 0.23 \times [(A4-A3)-(A2-A1)]$$

注: 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, 220μL=2.2×10⁻⁴ L; Cpr: 上清液蛋白质浓度 (mg/mL); W : 样品质量;

V 样: 加入反应体系中上清液体积, 20μL=0.02 mL; V 样总: 提取液体积, 1 mL; T: 反应时间 (min), 5min。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司: BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#))

b. 用 96 孔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℃或者 37℃中, 每毫克蛋白每分钟催化 1μmol CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

$$\text{计算公式: GST (U/mg prot)} = [(A4-A3)-(A2-A1)] \div \epsilon \div d \times 10^6 \times V \text{ 反总} \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T \\ = 0.46 \times [(A4-A3)-(A2-A1)] \div Cpr$$

2. 按样本质量计算

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

$$\text{计算公式: GST (U/g)} = [(A4-A3)-(A2-A1)] \div \epsilon \div d \times 10^6 \times V \text{ 反总} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 0.46 \times [(A4-A3)-(A2-A1)] \div W$$

3. 按细胞数量计算

活性单位定义：在 25℃或者 37℃中，每 10^4 个细胞每分钟催化 1 μmol CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

计算公式：GST (U/ 10^4 cell) = $[(A4-A3)-(A2-A1)] \div \epsilon \div d \times 10^6 \times V_{\text{反总}} \div (细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \div T$
 $= 0.46 \times [(A4-A3)-(A2-A1)] \div \text{细胞数量}$

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 1 个酶活单位。

计算公式：GST (U/mL) = $[(A4-A3)-(A2-A1)] \div \epsilon \div d \times 10^6 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T$
 $= 0.46 \times [(A4-A3)-(A2-A1)]$

注： ϵ : 产物摩尔消光系数, $9.6 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 96 孔板光径, 0.5cm; 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); W : 样品质量;
 $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积, $20\mu\text{L} = 0.02 \text{ mL}$; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1 mL; T : 反应时间 (min), 5min。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#))

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 AK089-A 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，若吸光度大于 1，需对样品用蒸馏水稀释，计算结果乘以稀释倍数；
4. 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)。