

# 谷胱甘肽—S 转移酶测定试剂盒说明书(精简版)

(货号:A004-1-1    Glutathione S-transferase    GST 比色法    100 管/48 样)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验,否则由此导致的后果用户自行承担!

### 一、试剂组成及配制: (试剂盒有效期 6 个月)

|                                                                                         | 试剂组成                          | 规格            | 保存条件    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|---------------|---------|
| 试剂一                                                                                     | 甲粉                            | 粉剂×1 支        | 2~8℃ 保存 |
|                                                                                         | 甲液配制: 加 1mL 无水乙醇充分溶解, 2~8℃ 保存 |               |         |
|                                                                                         | 乙液                            | 60mL×1 瓶      | 2~8℃ 保存 |
| 试剂一应用液配制: 甲液: 乙液=1: 59 的比例进行配制, 现用现配                                                    |                               |               |         |
| 试剂二                                                                                     | 甲粉                            | 粉剂×1 瓶        | 2~8℃ 保存 |
|                                                                                         | 乙液                            | 50mL×1 瓶      | 2~8℃ 保存 |
| 试剂二应用液配制: 将甲粉加双蒸水 172mL, 加热至 90~100℃ 充分溶解, 将甲乙两种溶液充分混合, 此为过饱和溶液, 室温保存。如出现结晶, 直接取上清进行实验。 |                               |               |         |
| 试剂三                                                                                     | 白色粉末                          | 粉剂×1 瓶        | 2~8℃ 保存 |
| 试剂三应用液配制: 加双蒸水 200mL, 充分溶解后备用 (可用我所送的塑料瓶配置) 室温保存。                                       |                               |               |         |
| 试剂四                                                                                     | 淡黄色粉末                         | 粉剂×1 支        | 2~8℃ 保存 |
| 试剂四应用液配制: 加双蒸水 50mL, 充分溶解, 避光 2~8℃ 保存。                                                  |                               |               |         |
| 试剂五                                                                                     | GSH 标准品                       | 3.07mg 粉剂×3 支 | 2~8℃ 保存 |
| 试剂六                                                                                     | GSH 标准溶剂贮备液                   | 10mL×1 瓶      | 2~8℃ 保存 |
| GSH 标准溶剂应用液配制: GSH 标准溶剂贮备液:双蒸水=1:9 的比例进行 10 倍稀释。                                        |                               |               |         |
| 1mmol/L GSH 标准溶液配制: 取 GSH 标准品一支加到标准品溶剂应用液 10mL 中混匀溶解, 4℃ 可保存 1-2 周。                     |                               |               |         |
| 20μmol/LGSH 标准品溶液配制: 取 1mmol/L 的 GSH 标准溶液 0.2mL 加标准品溶剂应用液 9.8mL, 现配现用。                  |                               |               |         |
| 基质液配制: 试剂一应用液与 1mmol/LGSH 标准溶液以 1:1 混合                                                  |                               |               |         |

### 二、适用范围:

本试剂盒适用于检测血清、组织、培养细胞等样本。

### 三、所需仪器耗材及试剂:

含 412nm 波长的分光光度计及 1cm 光径比色皿 (或酶标仪及 96 孔板)、37℃ 水浴锅或恒温箱、电炉 (配试剂加热用)、台式低速离心机、各种规格移液器、双蒸水、无水乙醇、生理盐水 (0.9%) 或 PBS (0.1M)、涡旋混匀器、试管或离心管、蛋白测定试剂 (组织及细胞样本用, 本公司有售)。

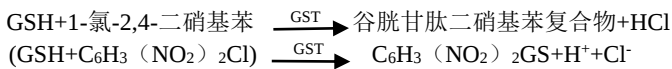
### 四、测定意义:

谷胱甘肽 S—转移酶 (glutathione S—transferase GST) 是一类与肝脏解毒有关的酶, 在肝细胞中存在量很大, 所以当肝细胞受损害时, GSH-ST 常常很早释放到血中, 血中 GSH-ST 的升高常常早于谷丙转氨酶 (SGPT) 和谷草转氨酶 (SGOT), 因而 GSH-ST 的升高可作为肝脏损伤的敏感指标。

谷胱甘肽 S—转移酶广泛存在于哺乳动物各组织中, 催化谷胱甘肽 (GSH) 与化学物质的亲电子基团结合, 最终形成硫醚氨酸排出体外, 在体内解毒功能上起重要作用。

GSH-ST 具有消除体内过氧化物及解毒双重功能。GST 在谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 活力低下的条件下, 只有清除体内脂质过氧化物 (LPO) 的功能。

### 五、测定原理:



GST 具有催化还原型谷胱甘肽 (GSH) 与 1-氯-2,4-二硝基苯 (CDNB 底物) 结合的能力, 在一定反应时间内, 其活性高低 与反应前后底物浓度的变化呈线性关系。

本实验通过检测 GSH 浓度的高低来反应 GST 活力的大小, GSH (底物) 浓度降低越多则 GST 活力越大。

### 六、样本前处理

1、50 倍稀释的溶血液的配制: 取肝素抗凝全血 20μL, 以双蒸水稀释至 1mL, 混匀, 放置 5 分钟进行测定。 配制好

的溶血液要在 1 小时内测定完, 否则影响酶活力; 抗凝全血若当天来不及测定可放冰箱 4℃ 保存, 2~3 天内酶活力变化不大。

2、组织、线粒体、微粒体、细胞等的前处理见本公司官网“技术支持”一栏。

3、血清或血浆可以直接取样。

### 七、操作步骤:

#### (一)、血清 (浆)、组织 (或细胞) 中 GST 活力测定:

##### 1、酶促反应

|                                   | 测定管 | 对照管 |
|-----------------------------------|-----|-----|
| 基质液(mL)                           | 0.3 | 0.3 |
| 样本(mL)                            | 0.1 |     |
| 混匀, 37℃ 水浴 30 分钟                  |     |     |
| 试剂二应用液(mL)                        | 2   | 2   |
| 样本(mL)                            |     | 0.1 |
| 混匀, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液作显色反应 |     |     |

##### 2、显色反应:

|                                      | 空白管 | 标准管 | 测定管 | 对照管 |
|--------------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| GSH 标准溶剂应用液(mL)                      | 2   |     |     |     |
| 20μmol/LGSH 标准溶液(mL)                 |     | 2   |     |     |
| 上清液(mL)                              |     |     | 2   | 2   |
| 试剂三应用液(mL)                           | 2   | 2   | 2   | 2   |
| 试剂四应用液(mL)                           | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| 混匀,室温放置 15 分钟, 1cm 光径双蒸水调零 412nm 处读数 |     |     |     |     |

##### 3、单位定义和计算公式

血清 (浆) 等液体样本单位定义: 规定每毫升血清 (浆) 在 37℃ 反应 1 分钟, 扣除非酶促反应, 使反应体系中 GSH 浓度降低 1μmol/L 为一个酶活力单位 U。

组织、细胞样本单位定义: 每毫克组织蛋白对应的酶量在 37℃ 每分钟扣除非酶促反应, 使反应体系中 GSH 浓度降低 1μmol/L 为一个酶活力单位 U。

##### 血清 (浆) 等液体样本计算公式:

$$\text{GST活力 (U/mL)} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N \div T \div V_{\text{样}} \times N_{\text{样}}$$

##### 组织、细胞样本计算公式:

$$\text{GST活力 (U/mgprot)} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N \div T \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr})$$

##### 上述公式中:

C 标准: 标准品浓度, 20μmol/L;

N: 反应体系稀释倍数, 6 (2.4mL / 0.4mL, 固定值);

T: 酶促反应时间, 30 分钟;

V 样: 样本取样量, 0.1mL;

N 样: 样本测试前稀释倍数。

Cpr: 组织匀浆蛋白浓度, mgprot/mL (prot 指蛋白);

#### (二)、溶血液 (全血 1: 49 加蒸馏水) 中 GST 活力测定:

##### 1、酶促反应

|                                   | 测定管 | 对照管 |
|-----------------------------------|-----|-----|
| 基质液(mL)                           | 0.2 | 0.2 |
| 待测溶血液(mL)                         | 0.2 |     |
| 混匀, 37℃ 水浴 30 分钟                  |     |     |
| 试剂二应用液(mL)                        | 2   | 2   |
| 待测溶血液(mL)                         |     | 0.2 |
| 混匀, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液作显色反应 |     |     |

##### 2、显色反应:

|                      | 空白管 | 标准管 | 测定管 | 对照管 |
|----------------------|-----|-----|-----|-----|
| GSH 标准溶剂应用液(mL)      | 2   |     |     |     |
| 20μmol/LGSH 标准溶液(mL) |     | 2   |     |     |
| 上清液 (mL)             |     |     | 2   | 2   |
| 试剂三应用液 mL)           | 2   | 2   | 2   | 2   |

|                                          |     |     |     |     |
|------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| 试剂四应用液(mL)                               | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| 混匀室温放置 15 分钟，1cm 光径，双蒸水调零 412nm 测各管 OD 值 |     |     |     |     |

3、单位定义和计算公式

**单位定义：**每毫升全血在 37℃每分钟，扣除非酶促反应，使反应体系中 GSH 浓度降低 1μmol/L 为一个酶活力单位 U。

**计算公式：**

$$\frac{\text{全血中GST}}{\text{活力 (U/mL)}} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N \div T \div V_{\text{全血}}$$

**V<sub>全血</sub>：**50 倍稀释溶血液取 0.2mL 进行测定相当于取全血 0.004mL(0.2mL ÷ 50 = 0.004mL)；

**C<sub>标准</sub>：**标准品浓度，20μmol/L；

**N：**反应体系稀释倍数，6（2.4mL / 0.4mL，固定值）；

**T：**酶促反应时间，30 分钟；

八、注意事项：

- 1、管子要洗干净，先用温肥皂水刷净，再用自来水冲 20 遍以上，最后用双蒸水过 1-2 次后烘干即可。
- 2、2 号试剂配制时最好是直接加热充分溶解。
- 3、肝素抗凝全血放置冰箱存放时间不可超过 3 天，血浆、组织块放-20℃可保存一个月以上。
- 4、1 号试剂配成贮备液后，冰箱冷藏至少可保存一个月。
- 5、20μmol/L 的 GSH 标准液现用现配。
- 6、上清液当天提取，当天测试。
- 7、组织蛋白的测定方法有多种，本研究所有供应。
- 8、样品前处理参照实验方法学部分。
- 9、本试剂盒仅用于科研、实验室。
- 10、正式实验前最好选取 2 例相对差异较大的样本进行预试，以熟悉操作和确定最佳样本浓度（最佳样本浓度为对照管 OD-测定管 OD 在 0.2 左右时为宜，不稀释时达不到 0.2 则直接原液操作）。