

## 谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferase, GST) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

### 测定意义:

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。**

### 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。

### 组成:

产品名称	GSH009-50T/48S	Storage
试剂一: 液体	50ml	4°C
试剂二: 液体	45ml	4°C
试剂三: 粉剂	1 瓶	4°C
说明书	一份	

试剂三: 粉剂×1 瓶, 4°C保存。临用前加 5 ml 蒸馏水溶解。

### 自备仪器和用品:

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

### 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°C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°C, 离心 10min, 取上清置于冰上待测。

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



3. 血清等液体：直接测定。

### 测定操作：

1. 分光光度计预热 30 min，调节波长到 340 nm，用蒸馏水调零。
2. 试剂三放在 25°C（一般物种）或者 37°C（哺乳动物）保温。
3. 测定管：取 1ml 石英比色皿，加入 100μl 上清液，900μl 试剂二和 100μl 试剂三，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。

### GST 活性计算公式：

(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 1nmol/L CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

$$\text{GST (nmol/min/mg prot)} = (A2 - A1) \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T \\ = 230 \times ((A2 - A1) \div Cpr)$$

(2). 按样本质量计算

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

$$\text{GST (nmol/min/g 鲜重)} = (A2 - A1) \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 230 \times (A2 - A1) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：在 25°C 或者 37°C 中，每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟催化 1nmol/L CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

$$\text{GST (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = (A2 - A1) \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 230 \times (A2 - A1) \div \text{细胞数量}$$

(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 1nmol/L CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

$$\text{GST (nmol/min/ml)} = (A2 - A1) \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div V \text{ 样} \div T \\ = 230 \times (A2 - A1)$$

$\epsilon$ : 产物摩尔消光系数, 9.6×10<sup>3</sup> L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; 10<sup>6</sup>: 1mol=1×10<sup>6</sup>μmol; V 反总: 反应体系总体积, 1100μl=0.0011 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; V 样: 加入反应体系中上清液体积, 100μl=0.1 ml; V 样总: 加入提取液体积, 1ml; W, 样本质量, g; T: 反应时间 (min), 5min。

### 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. 本法测定 GST 活性的线性范围可达 76 μmol/min/L，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. 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）。

