



# 谷草转氨酶 (AST/GOT) 测试盒

(货号: BC006 微板法)

## 一、测定原理:

AST/GOT 能使  $\alpha$ -酮戊二酸和天门冬氨酸移换氨基和酮基, 生成谷氨酸和草酰乙酸。草酰乙酸在反应过程中可自行脱羧成丙酮酸。丙酮酸与 2, 4 二硝基苯肼反应生成 2, 4 二硝基苯腙, 在碱性溶液中显红棕色。比色后, 查标准曲线, 可求得酶的活力单位。

## 二、试剂的组成与配制: (试剂盒有效期 6 个月)

试剂一: 基质液, 5mL×1 瓶, 4°C 保存。

试剂二: 显色剂, 5mL×1 瓶, 4°C 保存。

试剂三: 浓缩终止剂, 5mL×1 瓶, 室温密封保存; 临用时加蒸馏水 10 倍 (1:9) 稀释配成终止剂, 室温密封保存。

试剂四: 2 $\mu$ mol/mL 丙酮酸钠标准液×1 支, 4°C 保存。

试剂五: 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液×1 支, 4°C 保存。

## 三、所需仪器及试剂:

酶标仪 (505nm) 及 96 孔板 (附送一块), 37°C 水浴锅或恒温箱, 蒸馏水。

## 四、操作过程:

### 1、样本前处理:

① 血清 (浆) 及其它液体样本待测: 直接取样测定。

② 动物组织样本: 准确称取组织重量, 按重量(g):体积(mL)=1:9 的比例, 加入 9 倍体积的生理盐水, 冰水浴条件下机械匀浆, 制成 10% 的组织匀浆, 2500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液, 再用生理盐水稀释到适宜浓度待测。(取部分上清液测蛋白浓度, 蛋白定量试剂盒本所有售)

③ 培养细胞样本前处理: 将收集好的细胞用等渗缓冲液 (推荐 0.1mol/L pH7~7.4 磷酸盐缓冲液或生理盐水) 清洗 1~2 次; 1000 转/分, 离心 10 分钟, 弃上清, 留细胞沉淀, 加入匀浆介质 (推荐加入 0.01mol/L pH7~7.4 磷酸盐缓冲液或生理盐水), 冰水浴条件下超声破碎或手动匀浆, 制备好的匀浆液不离心, 待测。(取部分匀浆液测蛋白浓度, 蛋白测定试剂盒本公司有售 BC016)

### 2、操作表:

	测定孔	对照孔
试剂一 ( $\mu$ L) 37°C 已预温	20	20
待测样本 ( $\mu$ L)	5	
轻轻震荡孔板混匀, 37°C 反应 30 分钟		
试剂二 ( $\mu$ L)	20	20
待测样本 ( $\mu$ L)		5
轻轻震荡孔板混匀, 37°C 反应 20 分钟		
终止剂 ( $\mu$ L)	200	200
轻轻震荡孔板混匀, 室温放置 15 分钟, 波长 505nm, 酶标仪测定各孔 OD 值, 以绝对 OD 值(测定孔 OD 值减去对照孔 OD 值), 代入标准曲线计算, 求得相应的 AST/GOT 活力。		

注: 对照孔最好每个样本都做。

地址: 武汉市东湖新技术开发区高科园二路盛齐安生物产业园 4 号楼





ELK Biotechnology

Tel: +86-027-59760950 Website: www.elkbiotech.cn

## 五、计算：

### 1、血清（浆）等液体样本计算方法：

$$\text{AST活力 (U/L)} = \frac{\text{代入标准曲线得 AST活力 (卡门氏单位)}}{\times 0.482 \times N}$$

0.482:卡门氏单位到 U/L 的换算;

N: 样本测试前稀释倍数。

**举例：**取 SD 大鼠血清 5μL 在 96 孔板上按上述操作表进行，酶标仪 510nm 测得测定孔 OD 值为 0.2853，对照孔 OD 值为 0.2128，得绝对 OD 值=测定孔 OD 值减去对照孔 OD=0.0725，代入标准曲线所得拟合公式中得：血清中 AST 活力=24.4210 卡门氏单位=11.7709U/L。

### 2、组织、细胞类样本计算方法：

$$\text{AST活力 (U/gprot)} = \frac{\text{代入标准曲线得 AST活力 (卡门氏单位)}}{\times 0.482 \div C_{pr}}$$

0.482:卡门氏单位到 U/L 的换算;

C<sub>pr</sub>:组织匀浆蛋白浓度,gprot/L(prot 指蛋白)。

**举例：**取小鼠部分肝组织按重量体积比 1: 9 制备成 10% 匀浆，再用生理盐水稀释到 1% 的浓度操作表进行操作，酶标仪 510nm 测得测定孔 OD 值为 0.3594，对照孔 OD 值为 0.2175，得绝对 OD 值=测定孔 OD 值减去对照孔 OD=0.1419，代入标准曲线所得拟合公式中,同时测得 1% 小鼠肝匀浆蛋白浓度为 1.028gprot/L，计算得：

$$\begin{aligned} \text{小鼠肝中 AST 活力 (U/gprot)} &= 67.4646 \times 0.482 \div 1.028 \\ &= 31.6322 \text{ U/gprot} \end{aligned}$$

## 六、注意点：

- 1、比色法中常用的有赖氏 (Reitman-Frankel) 法及金氏 (King) 法。赖氏法标准曲线所定单位数，是用实验方法和卡门氏分光光度法（速率法）作对比测定求得的。以卡门氏单位报告结果，比较准确。
- 2、一般血清标本内源性酮酸很少，血清对照孔吸光度值相近。可将一般血清的对照孔（或称标本空白孔）的吸光度作为日常质控的指标之一；如相差大，可考虑α-酮戊二酸浓度、DNPH 浓度及仪器等原因引起。
- 3、血清（浆）或组织匀浆上清酶活力超过 150 卡门氏单位时，用生理盐水稀释后重测。
- 4、血清中 AST 在室温 (25°C) 可保存 2 天，在 0~4°C 可保存一周，在 -25°C 可保存 1 个月。





ELK Biotechnology

Tel: +86-027-59760950 Website: [www.elkbiotech.cn](http://www.elkbiotech.cn)

ELK Biotechnology

5、试剂一提前 5-10 分钟置于 37℃ 预温。

6、标准曲线每盒试剂至少做一次。

7、**卡门氏单位定义：**1mL 液体，反应液总容量 3mL，波长 340nm，1cm 光径，25℃，1min 内所生成的丙酮酸，使 NADH 氧化成 NAD<sup>+</sup>而引起吸光度每下降 0.001 为一个单位 (**1 卡门氏单位=0.482 U/L，25℃**)。

地址：武汉市东湖新技术开发区高科园二路盛齐安生物产业园 4 号楼





# 附录 I : AST 标准曲线

## 1、操作表:

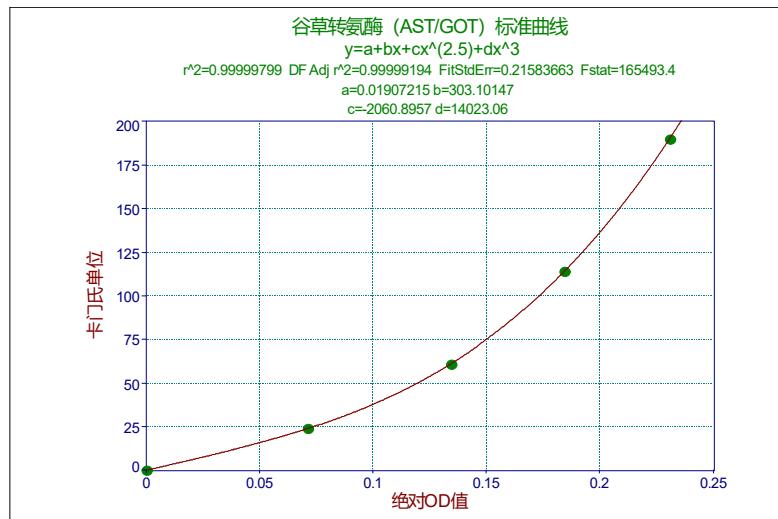
	0	1	2	3	4
试剂五 ( $\mu\text{L}$ )	5	5	5	5	5
2 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 丙酮酸钠标准液 ( $\mu\text{L}$ )	0	2	4	6	8
试剂一 ( $\mu\text{L}$ )	20	18	16	14	12
试剂二 ( $\mu\text{L}$ )	20	20	20	20	20
轻轻震荡孔板混匀, 37°C 反应 20 分钟					
终止剂 ( $\mu\text{L}$ )	200	200	200	200	200

轻轻震荡孔板混匀, 室温放置 15 分钟, 波长 505nm, 酶标仪测定各孔 OD 值, 各孔 OD 值减去零孔 OD 值, 所得差值=绝对 OD 值作为横坐标, 相应的卡门氏单位为纵坐标, 作坐标图拟合公式, 可在 Excel 表中用公式计算样本中的 AST 酶活性。

## 2、测定结果(附参考标准曲线)

各标准孔参考 OD 值	0.2272	0.2985	0.3616	0.4117	0.4582
绝对 OD 值	0	0.0713	0.1344	0.1845	0.2310
相当于酶活力卡门氏单位	0	24	61	114	190

作图如下: (标曲拟合后公式有很多种, 下面选择一种作为参考)



**【注】:** 标准曲线需要客户自己制作才更准确, 操作步骤参照上表; 上表所列的卡门氏单位数值与各标准孔的标准品加样量是对应的, 所以该值固定不变, 客户可以由此值和自己按操作表求得的各标准孔的 OD 值作多项式曲线 ( $R^2 \geq 0.99$ ), 得到计算公式用于样本计算

