

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 α -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℃ 保存。

试剂二: 显色剂, 5mL×1 瓶, 4℃ 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 μ mol/mL 丙酮酸钠标准液×1 支, 4℃ 保存。

试剂五: 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液×1 支, 4℃ 保存。

三、所需仪器及试剂:

酶标仪 (505nm) 及 96 孔板 (附送一块), 37℃ 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 (μ L) 37℃ 已预温	20	20
待测样本 (μ L)	5	
轻轻震荡孔板混匀,37℃ 反应 30 分钟		
试剂二 (μ L)	20	20
待测样本 (μ L)		5
轻轻震荡孔板混匀,37℃ 反应 20 分钟		
终止剂 (μ 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。



五、计算：

1、血清（浆）等液体样本计算方法：

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

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：

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

0.482: 卡门氏单位到 U/L 的换算;

Cpr: 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℃）可保存 2 天，在 0~4℃ 可保存一周，在 -25℃ 可保存 1 个月。



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^+ 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℃）。



附录 I：AST 标准曲线

1、操作表:

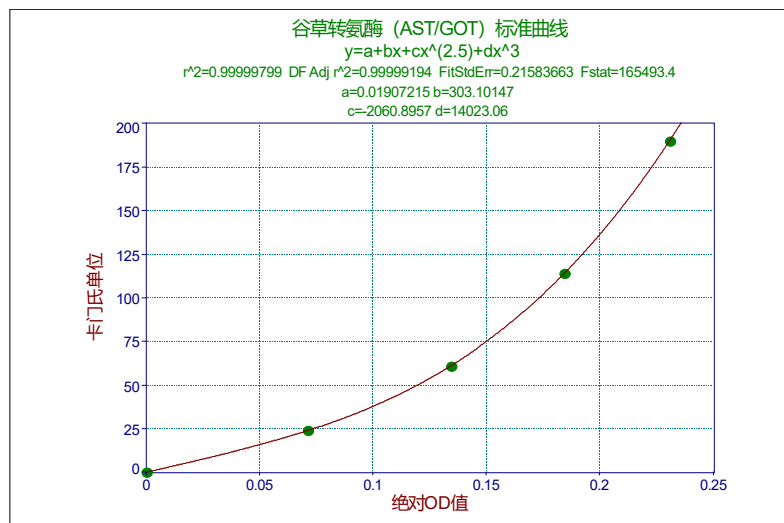
	0	1	2	3	4
试剂五 (μL)	5	5	5	5	5
2μmol/mL 丙酮酸钠标准液 (μL)	0	2	4	6	8
试剂一 (μL)	20	18	16	14	12
试剂二 (μL)	20	20	20	20	20
轻轻震荡孔板混匀,37℃反应 20 分钟					
终止剂 (μL)	200	200	200	200	200

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

