

# 谷胱甘肽—S 转移酶测定试剂盒

(货号: BC045 GST 比色法 100 管/48 样)

## 一、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。

## 二、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: 每支粉剂加 1mL 无水乙醇充分溶解, 2~8℃可保存一个月(颜色变深后弃用) |               |        |
|   | 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: 将甲粉加蒸馏水 172mL, 加热至 90~100℃搅拌充分溶解, 再将甲乙两种溶液混合并搅拌均匀, 此混合液为过饱和溶液, 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: 加蒸馏水 200mL, 常温溶解后备用 (可用赠送的塑料瓶配置), 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: 加蒸馏水 50mL, 常温溶解, 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: 蒸馏水=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/L GSH 标准品溶液配制: 取 1mmol/L 的 GSH 标准溶液 0.1mL 加标准品溶剂应用液 4.9mL, 现配现用。                         |   |               |        |
| 基质液配制: 试剂一应用液与 1mmol/L GSH 标准溶液以 1:1 混合, 现用现配   |   |               |        |

## 三、适用范围:

本试剂盒可用于检测血清、组织、培养细胞等样本。

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

#### 四、所需仪器:

可见分光光度计及 1cm 光径比色皿 (或酶标仪 (400~415nm) 及 96 孔板)、37°C 恒温水浴箱、电炉、低速离心机、蛋白测定试剂 (本公司有售)。

#### 五、样本前处理

- 1、血清或血浆：可以直接使用。
- 2、组织样本前处理：称取待测动物组织的重量，按重量 (g)：体积(mL)=1:9 的比例，加入 9 倍体积的生理盐水，低温 (0-4°C) 条件匀浆，3500 转/分，离心 10 分钟，取上清液待测 (制备好的匀浆上清液需要测定其蛋白浓度，蛋白测定试剂盒本公司有售 BC016)。
- 3、细胞样本前处理：(贴壁细胞) 用细胞刮配合等渗 PBS 刮下或用胰酶消化下来 (消化后加入 0.5-1mL 等渗 PBS 冲洗)，再将细胞悬液转移到另一离心管中，1000 转/分，离心 10 分钟，弃上清液，留细胞沉淀；用等渗 PBS 再清洗 1~2 次，同样 1000 转/分，离心 10 分钟，弃上清液，留细胞沉淀 (若不立即测定，可直接放 -20°C 或 -80°C 冰箱保存，3 个月内可用)；往细胞沉淀中加入 0.2~0.3mL 的匀浆介质 (推荐生理盐水) (加完匀浆介质后轻轻混匀细胞溶液，使其均匀，吸取少量进行细胞计数；若是破碎后可以测蛋白，则不用细胞计数)，冰水浴条件下超声破碎 (功率:200~300W,3~5 秒/次,间隔 15 秒，重复运行 3~5 分钟)或手动匀浆，制备好的匀浆液若比较均匀可不离心直接测定。也可采用裂解液裂解 (推荐 TritonX-100, 1~2%浓度 0.1mL, 冰上裂解 30~40 分钟),裂解好的液体可不离心直接测定。[注]：建议细胞数在 100 万个以上 (数量越多，测定效果越好)。破碎好的液体可显微镜观察细胞是否破碎完全。
- 4、制备溶血液：取肝素抗凝全血 20 $\mu$ L，用蒸馏水稀释至 1mL (50 倍稀释)，混匀，4°C 静置 5 分钟后进行测定。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°C 保存，2~3 天内酶活力变化不大。

#### 六、操作步骤:

##### (一)、血清 (浆)、组织、细胞样本操作:

##### 第一步：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°C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 |     |     |

##### 第二步：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   |     |     |     |
| 20 $\mu$ mol/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 光径蒸馏水调零波长 412nm 处分光光度计读取各管吸光值 A (或是每管吸取 200 $\mu$ L 反应液，加到 96 孔板中，酶标仪 412nm 处读数) |     |     |     |     |

注意：A<sub>对照</sub> - A<sub>测定</sub> 值大于 0.3 时，将样本稀释后再测，或是预先做好预试，将 A<sub>对照</sub> - A<sub>测定</sub> 值控制在 0.1~0.2 之间 (酶标仪读数可在 0.1 左右，酶活力较低时该值大于 0.02 即可)。

##### 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°C 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°C 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<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；

**V<sub>样</sub>**：样本取样量，0.1mL；

**N<sub>样</sub>**：样本测试前稀释倍数。

**Cpr**：组织匀浆蛋白浓度，mgprot/mL（prot 指蛋白）；

#### 4、计算举例

**例 1：**取罗非鱼血清原液 0.1mL 检测 GSH-ST 的活力，测得测定管吸光值为 0.436，对照管吸光值为 0.485，标准管吸光值为 0.160，空白管吸光值为 0.037，则计算如下：

$$\begin{aligned} \text{血清GST活力 (U/mL)} &= \frac{0.485 - 0.436}{0.160 - 0.037} \times 20 \times 6 \div 30 \div 0.1 \\ &= 15.93\text{U/mL} \end{aligned}$$

**例 2：**取猪血清原液 0.1mL 检测 GSH-ST 的活力，测得测定管吸光值为 0.403，对照管吸光值为 0.475，标准管吸光值为 0.160，空白管吸光值为 0.037，则计算如下：

$$\begin{aligned} \text{血清GST活力 (U/mL)} &= \frac{0.475 - 0.403}{0.160 - 0.037} \times 20 \times 6 \div 30 \div 0.1 \\ &= 23.41\text{U/mL} \end{aligned}$$

**例 3：**取 10%小鼠肝组织匀浆，用生理盐水 5 倍稀释成 2%浓度后按操作表进行操作，测得测定管吸光值为 0.251，对照管吸光值为 0.455，标准管吸光值为 0.160，空白管吸光值为 0.037，而 2%匀浆液蛋白浓度为 1.15mgprot/mL，计算如下：

$$\begin{aligned} \text{组织中GST活力 (U/mgprot)} &= \frac{0.455 - 0.251}{0.160 - 0.037} \times 20 \times 6 \div 30 \div (0.1 \times 1.15) \\ &= 57.69\text{U/mgprot} \end{aligned}$$

#### (二)、溶血液（全血 1：49 加蒸馏水）样本操作：

##### 第一步：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°C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 |     |     |

##### 第二步：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, 蒸馏水调零 412nm 处分光光度计读取各管吸光值 A (或是每管吸取 200μL 反应液, 加到 96 孔板中, 酶标仪 412nm 处读数) |     |     |     |     |

### 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：**

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

**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；

### 4、计算举例

取全血 20μL 配制 1:49 的溶血液，取 0.2mL 溶血液检测 GST 活力，测得测定管吸光值为 0.231，对照管吸光值为 0.280，标准管吸光值为 0.160，空白管吸光值为 0.037。

$$\begin{aligned} \text{全血中 GST 活力 (U/mL 全血)} &= \frac{0.280 - 0.231}{0.160 - 0.037} \times 20 \times 6 \div 0.004 \div 30 \\ &= 398.37 \text{ U/mL 全血} \end{aligned}$$

### 七、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。

### 八、注意事项：

- 1、试剂二甲粉配制时最好是直接加热的方式溶解，水浴或烘箱等间接加热方式可能无法使其溶解。
- 2、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。
- 3、上清液当天提取，当天测试。
- 4、本试剂盒仅用于科研、实验室。