

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

微量法 100T/96S

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

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。

自备仪器和用品：

低温离心机、水浴锅、可调节移液器、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板、和蒸馏水。

试剂组成和配置：

试剂一：液体120mL×1瓶，4℃保存。

试剂二：液体22mL×1瓶，4℃保存。

试剂三：粉剂×1瓶，4℃保存。临用前加2 mL蒸馏水溶解。

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℃离心10min，取上清置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量（10⁴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℃，离心10min，取上清置于冰上待测。
3. 血清等液体：直接测定。

测定：

1. 分光光度计/酶标仪预热30 min，调节波长到340 nm，用蒸馏水调零。
2. 试剂三放在25℃（一般物种）或者37℃（哺乳动物）保温。
3. 测定管：取微量石英比色皿或96孔板，加入20μL上清液，180μL试剂二和20μL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：

a.使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1). 按蛋白浓度计算

活性单位定义：在25℃或者37℃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。

$$\text{GST (nmol/min/mg prot)} = (A2 - A1) \div \varepsilon \div d \times 109 \times V_{\text{反总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T$$
$$= 230 \times (A2 - A1) \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$\text{GST (nmol/min/g 鲜重)} = (A2-A1) \div \epsilon \div d \times 109 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 230 \times (A2-A1) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：在25°C或者37°C中，每104个细胞每分钟催化1nmol/L CDNB与GSH结合为1个酶活单位。

$$\text{GST (nmol/min/104 cell)} = (A2-A1) \div \epsilon \div d \times 109 \times V_{\text{反总}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 230 \times (A2-A1) \div \text{细胞数量}$$

(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。

$$\text{GST (nmol/min/mL)} = (A2-A1) \div \epsilon \div d \times 109 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T$$
$$= 230 \times (A2-A1)$$

ϵ : 产物摩尔消光系数, $9.6 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 比色皿光径, 1cm ; 106 : $1\text{mol}=1 \times 10^6 \mu\text{mol}$; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $220 \mu\text{L}=2.2 \times 10^{-4} \text{ L}$; C_{pr} : 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; W : 样品质量; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积, $20 \mu\text{L}=0.02 \text{ mL}$; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1 mL ; T : 反应时间 (min), 5min 。

b.使用96孔板测定的计算公式如下

(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。

$$\text{GST (nmol/min/mg prot)} = (A2-A1) \div \epsilon \div d \times 109 \times V_{\text{反总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T$$
$$= 460 \times (A2-A1) \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$\text{GST (nmol/min/g 鲜重)} = (A2-A1) \div \epsilon \div d \times 109 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 460 \times (A2-A1) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：在25°C或者37°C中，每104个细胞每分钟催化1nmol/L CDNB与GSH结合为1个酶活单位。

$$\text{GST (nmol/min/104 cell)} = (A2-A1) \div \epsilon \div d \times 109 \times V_{\text{反总}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 460 \times (A2-A1) \div \text{细胞数量}$$

(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。

$$\text{GST (nmol/min/mL)} = (A2-A1) \div \epsilon \div d \times 109 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T$$
$$= 460 \times (A2-A1)$$

ϵ : 产物摩尔消光系数, $9.6 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 96孔板光径, 0.5cm ; 106 : $1\text{mol}=1 \times 10^6 \mu\text{mol}$; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $220 \mu\text{L}=2.2 \times 10^{-4}$

4 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; W : 样品质量; V样: 加入反应体系中上清液体积, 20 μ L=0.02 mL; V样总: 提取液体积, 1 mL; 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 μ mol/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 $^{\circ}$ C或者37 $^{\circ}$ C (哺乳动物)。

www.affandi-e.com