

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

(货号: ADS-F-G005 紫外法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

谷胱甘肽转移酶 (GST; EC 2.5.1.18) 是一种具有多种生理功能的蛋白质家族, 清除潜在毒性化合物, 包括由氧化应激产生的物质, 是细胞防御机制的一部分。

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。

二、试剂盒组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体 3 瓶	-20℃保存	每瓶: 1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 8.5mL 提取液溶解, 可分装保存至-20℃, 一个月内用完。
试剂二	液体 2.5mL×1 瓶	4℃保存	

【注】: 反应 mix 的制备 (现配现用): 按照试剂一: 试剂二: 提取液=10:1:9 的比例混匀。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 石英比色皿、离心管、紫外分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本提取:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织 (水分充足的果实样本可以取 0.2g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一; 冰浴超声波破碎细菌或细胞 (功率 300w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min); 12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。(或按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 试剂一体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取)

【注】: 不能用细胞裂解液处理细胞。

③ 液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、检测步骤:

① 紫外分光光度计预热 30 min, 温度设定 37℃, 调节波长到 340 nm, 蒸馏水调零。

② 可先做 2 个样本预测定, 熟悉操作过程, 并依据测出的吸光值 A 是否符合预判做相应调整。

③ 在 1 mL 比色杯孔板中依次按照下表加入试剂:

试剂组分 (μL)	测定管
样本	50
反应 mix	950

混匀，37°C下，立即于 340nm 下读取 A1 值，10min 后读取 A2 值。 $\Delta A = A2 - A1$ 。

- 【注】：1. 若 ΔA 过小，可以延长反应时间（如：15min 或更长），或增加样本加样体系 V1（如增至 100 μ L，则反应 mix 相应减少），则改变后的反应时间 T 和加样体积 V1 需代入计算公式重新计算。
2. 若 A2 大于 1.5，可以缩短反应时间（如 2min），或减少样本加样体系 V1（如减至 25 μ L，则反应 mix 相应增加），则改变后的反应时间 T 和加样体积 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按蛋白浓度计算：

活性单位定义：在上述反应条件下，每毫克蛋白每分钟催化 1nmol 的 CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

$$\text{GST}(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T = 208.4 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本质量计算：

活性单位定义：在上述反应条件下，每克样品每分钟催化 1nmol/L CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

$$\text{GST}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 208.4 \times \Delta A \div W$$

3、按细胞数量计算：

活性单位定义：在上述反应条件下，每 10⁴ 个细胞每分钟催化 1nmol/L CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

$$\text{GST}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) \div T = 208.4 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

4、按液体体积计算：

活性单位定义：在上述反应条件下，每毫升液体每分钟催化 1nmol/L CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

$$\text{GST}(\text{nmol/min/mL}) = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 208.4 \times \Delta A$$

ϵ ---产物摩尔消光系数，9.6 $\times 10^3$ L/mol /cm；

d---比色皿光径，1cm；

V---加入提取液体积，1mL；

V1---样本加样体积，50 μ L=0.05 mL；

V2---反应体系总体积，1000 μ L=1 $\times 10^{-3}$ L；

T---反应时间，10min；

W---样本质量，g；

Cpr---上清液蛋白质浓度（mg/mL），建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。