

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

(货号: ADS-W-G005 微板法 96 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 125mL×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 4mL 提取液溶解, 可分装保存至 -20℃, 一个月内用完。
试剂二	液体 1.5mL×1 支	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)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

### 四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

#### 1、样本提取:

##### ① 组织样本:

称取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 0.2g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm 4℃ 离心 15min, 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 提取液; 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 15min, 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 酶标仪预热 30 min, 温度设定 37℃, 调节波长到 340 nm。

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 96 孔板中依次按照下表加入试剂:

试剂组分 (μL)	测定管
样本	10
反应 mix	190

混匀，37℃下，立即于340nm下读取A1值，5min后读取A2值，  
 $\Delta A = A2 - A1$ 。

- 【注】**：1. 若 $\Delta A$ 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20 $\mu$ 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5 $\mu$ 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。

$$GST(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (Cpr \times V1) \div T = 833.3 \times \Delta A \div Cpr$$

### 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的CDNB与GSH结合为1个酶活单位。

$$GST(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 833.3 \times \Delta A \div W$$

### 3、按细胞数量计算：

活性单位定义：在上述反应条件下，每10<sup>4</sup>个细胞每分钟催化1nmol的CDNB与GSH结合为1个酶活单位。

$$GST(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) \div T = 833.3 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

### 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的CDNB与GSH结合为1个酶活单位。

$$GST(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 833.3 \times \Delta A$$

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

d---96孔板光径，0.5cm；

V---提取液体积，1 mL；

V1---样本加样体积，10 $\mu$ L=0.01 mL；

V2---反应体系总体积，200 $\mu$ L=2 $\times 10^{-4}$  L；

T---反应时间，5min；

W---样品质量，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。