

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 100mL×1 瓶，4°C 保存。

试剂二：液体 20mL×1 瓶，4°C 保存。

试剂三：粉剂×1 瓶，4°C 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°C 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°C，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°C（一般物种）或者 37°C（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°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。

$$\text{GST (nmol/min/mg prot)} = \frac{(A2-A1) \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T}{= 230 \times (A2-A1) \div Cpr}$$

(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。

$$\text{GST (nmol/min/g 鲜重)} = \frac{(A2-A1) \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T}{= 230 \times (A2-A1) \div W}$$

(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。

$$\text{GST (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = \frac{(A2-A1) \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T}{= 230 \times (A2-A1) \div \text{细胞数量}}$$

(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。

$$\text{GST (nmol/min/mL)} = \frac{(A2-A1) \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div V \text{ 样} \div T}{= 230 \times (A2-A1)}$$

ε：产物摩尔消光系数，9.6×10³ L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；10⁶：1mol=1×10⁶μmol；V 反总：反应体系总体积，220μL=2.2×10⁻⁴ 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，20μL=0.02 mL；V 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。

$$\text{GST (nmol/min/mg prot)} = (A2-A1) \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T \\ = 460 \times (A2-A1) \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{GST (nmol/min/g 鲜重)} = (A2-A1) \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 460 \times (A2-A1) \div W$$

(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。

$$\text{GST (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = (A2-A1) \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 460 \times (A2-A1) \div \text{细胞数量}$$

(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。

$$\text{GST (nmol/min/mL)} = (A2-A1) \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div V \text{ 样} \div T \\ = 460 \times (A2-A1)$$

ϵ : 产物摩尔消光系数, 9.6×10³ L/mol/cm; d : 96 孔板光径, 0.5cm; 10⁶: 1mol=1×10⁶μmol; V 反总: 反应体系总体积, 220μL=2.2×10⁻⁴ 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, 20μL=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 μmol/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°C 或者 37°C (哺乳动物)。