

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°C保存。

试剂二：液体22mL×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（ 10^4 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10s和310s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。

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

$$=230 \times (A2-A1) \div Cpr$$

(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。

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

(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。

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

(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。

$$\begin{aligned} GST \text{ (nmol/min/mL)} &= (A2-A1) \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 230 \times (A2-A1) \end{aligned}$$

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。

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

(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。

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

(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。

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

(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。

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

$$=460 \times (A2 - A1)$$

ϵ : 产物摩尔消光系数, 9.6×10^3 L/mol/cm; d : 96孔板光径, 0.5cm; 10^6 : $1\text{mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $220 \mu\text{L} = 2.2 \times 10^{-4}$ 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, $20 \mu\text{L} = 0.02$ mL; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1 mL; T : 反应时间 (min), 5min。

谷胱甘肽S-转移酶 (glutathione S-transferase, GST) 试剂盒说明书 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 $76 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$, 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)。

www.pyram.cn