

凯基谷胱甘肽—S 转移酶测定试剂盒

说明书修订日期：2015.07.13

Cat number: KGT005

Store at 4℃ for for 6 months

For Research Use Only (科研专用)

一、测定意义、原理

GSH-ST 具有消除体内过氧化物及解毒双重功能。GST 在谷胱甘肽过氧化物酶活力低下的条件下，只有消除体内脂质过氧化物 (LPO) 的功能。

谷胱甘肽-S 转移酶 (GST) 具有催化还原型谷胱甘肽 (GSH) 与 1 氯-2, 4-二硝基苯结合的能力，在一定反应时间内，其活性高低与反应前后底物浓度的变化呈线性关系。本实验通过检测 GSH 浓度的高低来反应 GST 活力的大小：GSH (底物) 浓度降低越多则 GST 活力越大。

二、试剂盒组份

组份	KGT005 100 assays	保存条件
试剂 A 粉剂	一支	2-8℃, 6 个月
Buffer A	60 mL	
试剂 B-1 粉剂	一瓶	
Buffer B	50 mL	
试剂 C 粉剂	一瓶	
试剂 D 粉剂	一支	
GSH 标准品	3.07 mg×3 支	
GSH 标准品溶剂储备液	10mL	

注意事项

1. 试剂 A 粉剂用时加 1mL 无水乙醇溶解得溶液 1, 溶液 1 与 Buffer A 按比例 (溶液 1 : Buffer A=1 : 59) 配制为 A 工作液。
2. 试剂 B-1 粉末用时加 90~100℃ 热双蒸水 170mL, 充分完全溶解, 将 Buffer B 与 B-1 粉末溶液充分混合, 此为过饱和溶液室温保存。(如有结晶, 则取上清进行实验)。
3. 试剂 C 粉剂用时加双蒸水至 200mL, 适当加热充分溶解, 得 C 工作液, 4℃ 保存。
4. 试剂 D 粉剂用时加双蒸水至 50mL, 充分溶解, 得 D 工作液, 4℃ 避光保存。
5. GSH 标准品溶剂工作液: 取贮备液用蒸馏水 10 倍稀释为工作液。
6. 1mmol/L GSH 标准品溶液的配制: 取 GSH 标准品 1 支 (3.07mg) 加到已配制的 GSH 标准品溶剂工作液 10mL 中溶解 (现用现配) 即得。
7. 20μmol/L GSH 标准品溶液的配制: 取 1mmol/L GSH 标准品溶液 0.2mL 加 GSH 标准品溶剂工作液 9.8mL。
8. 基质液的配制: A 工作液与 1mmol/L GSH 标准品溶液以 1 : 1 混合而成。

三、样品前处理

1. 血清(浆): 血清、血浆可直接取样进行检测。
2. 50倍稀释的溶血液: 取肝素抗凝全血 20ul, 以蒸馏水稀释至 1ml, 混匀, 放置 5 分钟进行测定。配制好的溶血液要在 1 小时内测定完, 否则影响酶活力; 抗凝全血若当天来不及测定可放冰箱 4℃ 保存, 2-3 天内酶活力变化不大。
3. 组织匀浆、线粒体、微粒体等的制备见实验方法学部分。

四、血清、血浆的测定

1. 酶促反应:

	测定管 (酶管)	对照管 (非酶管)
基质液 (mL)	0.3	0.3
血清 (浆) (mL)	0.1	
混匀, 37℃水浴 30 分钟		
B 工作液 (mL)	2	2
血清 (浆) (mL)		0.1

混匀, 3500~4000 转/分, 离心 10 分钟。取上清液作以下显色反应。

2. 显色反应

	空白管	标准管	对照管 (非酶管)	测定管 (酶管)
B 工作液 (mL)	2			
20μmol/LGSH 标准品溶液 (mL)		2		
上清液 (mL)			2	2
C 工作液 (mL)	2	2	2	2
D 工作液 (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5

混匀, 室温放置 15 分钟, 于 412nm 处, 1cm 光径, 蒸馏水调零, 测定各管吸光度值。

3. 计算公式:

(1) 定义: 规定每毫升血清 (浆) 在 37℃ 反应 1 分钟, 扣除非酶促反应, 使反应体系中 GSH 浓度降低 1μmol/L 为一个酶活力单位。

(2) 血清 (浆) 中 GST 计算公式:

$$GST\text{活力}(U/mL) = \frac{\text{非酶管吸光度} - \text{酶管吸光度}}{\text{标准管吸光度} - \text{空白管吸光度}} \times \text{标准管浓度} (20\mu\text{mol/L}) \times \text{反应稀释倍数} (6) \div \text{反应时间} (30\text{分钟}) \div \text{取样量} (0.1\text{mL})$$

注: 反应稀释倍数: 反应液共 0.4mL (0.3mL 基质液+0.1mL 样本) 加 B 工作液 2mL, 共稀释 6 倍。

五、组织匀浆的测定

1. 酶促反应:

	测定管 (酶管)	对照管 (非酶管)
基质液 (mL)	0.3	0.3
10%组织匀浆上清 (mL)	0.1	
混匀, 37℃水浴 10 分钟 (准确计时)		
B 工作液 (mL)	1	1
无水乙醇 (mL)	1	1
10%组织匀浆上清 (mL)		0.1

混匀, 3500~4000 转/分, 离心 10 分钟。取上清液作以下显色反应。

2. 显色反应

	空白管	标准管	对照管 (非酶管)	测定管 (酶管)
B 工作液 (mL)	2			
20 μ mol/LGSH 标准品溶液 (mL)		2		
上清液 (mL)			2	2
C 工作液 (mL)	2	2	2	2
D 工作液 (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5

混匀，室温放置 15 分钟，于 412nm 处，1cm 光径，蒸馏水调零，测定各管吸光度值。

3. 计算公式：

(1) 定义：规定每毫克组织蛋白，在 37℃ 反应 1 分钟，扣除非酶促反应，使反应体系中 GSH 浓度降低 1 μ mol/L 为一个酶活力单位。

(2) 组织中 GST 计算公式：

$$GST\text{活力}(U/mg\text{prot}) = \frac{\text{非酶管吸光度} - \text{酶管吸光度}}{\text{标准管吸光度} - \text{空白管吸光度}} \times \text{标准品浓度} (20\mu\text{mol/L}) \times \text{反应稀释倍数} (6) \div \text{反应时间} (10\text{分钟}) \\ \div \text{取样量} (0.1\text{mL}) \div \text{待测液中蛋白含量} (mg\text{prot/ml})$$

六、50 倍稀释的溶血液的测定

1. 酶促反应

	测定管 (酶管)	对照管 (非酶管)
基质液 (mL)	0.2	0.2
50 倍稀释的溶血液 (mL)	0.2	
混匀，37℃ 水浴 30 分钟		
B 工作液 (mL)	2	2
50 倍稀释的溶血液 (mL)		0.2

混匀，3500~4000 转/分，离心 10 分钟。取上清液作以下显色反应。

2. 显色反应

	空白管	标准管	对照管 (非酶管)	测定管 (酶管)
B 工作液 (mL)	2			
20 μ M GSH 标准品溶液 (mL)		2		
上清液 (mL)			2	2
C 工作液 (mL)	2	2	2	2
D 工作液 (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5

混匀，室温放置 15 分钟，于 412nm 处，1cm 光径，蒸馏水调零，测定各管吸光度值。

3. 计算公式

(1) 定义：规定每毫升全血在 37℃ 反应 1 分钟，扣除非酶促反应，使反应体系中 GSH 浓度降低 1 μ mol/L 为一个酶活力单位。

(2) 全血中 GST 计算公式：

$$GST\text{活力}(U/ml\text{全血}) = \frac{\text{非酶管吸光度} - \text{酶管吸光度}}{\text{标准管吸光度} - \text{空白管吸光度}} \times \text{标准品浓度} (20\mu\text{mol/L}) \times \text{反应稀释倍数} (6) \div \text{反应时间} (30\text{分钟}) \div \text{取样量} (0.004\text{mL})$$