

谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

货号: AC10136

规格: 50T/48S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 50 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	液体 45 mL×1 瓶	4°C保存
试剂三	粉剂×1 瓶	4°C保存

溶液配制:

试剂三: 临用前加 5 mL 蒸馏水溶解。

产品说明:

谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferase, 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。

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。

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

紫外-可见分光光度计、低温离心机、水浴锅、可调节移液器、研钵/匀浆器、1mL 石英比色皿和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

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。

二、测定步骤

1. 分光光度计预热 30 min 以上, 调节波长到 340 nm, 用蒸馏水调零。

2. 试剂二放在 25°C（一般物种）或者 37°C（哺乳动物）保温。
3. 空白管：取 1mL 石英比色皿，加入 100μL 试剂一，900μL 试剂二和 100μL 试剂三，迅速混匀后于 340nm 测定 10s 吸光度记 A1，25°C（一般物种）或者 37°C（哺乳动物）水浴 5min 后，快速取出测定吸光度记 A2。
4. 测定管：取 1mL 石英比色皿，加入 100μL 上清液，900μL 试剂二和 100μL 试剂三，迅速混匀后于 340nm 测定 10s 吸光度记 A3，25°C（一般物种）或者 37°C（哺乳动物）水浴 5min 后，快速取出测定吸光度记 A4。

三、GST 活性计算

(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 1μmol CDNB 与 GSH 结合为一个酶活性单位。

$$\text{GST (U/mg prot)} = [(A4-A3)-(A2-A1)] \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V \text{ 反总} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T = 0.23 \times [(A4-A3)-(A2-A1)] \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本质量计算

活性单位定义：在 25°C 或者 37°C 中，每克样本每分钟催化 1μmol CDNB 与 GSH 结合为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{GST (U/g 质量)} &= [(A4-A3)-(A2-A1)] \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T \\ &= 0.23 \times [(A4-A3)-(A2-A1)] \div W \end{aligned}$$

(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 1μmol CDNB 与 GSH 结合为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{GST (U/10}^4 \text{ cell)} &= [(A4-A3)-(A2-A1)] \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V \text{ 反总} \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 0.23 \times [(A4-A3)-(A2-A1)] \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(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 1μmol CDNB 与 GSH 结合为一个酶活单位。

$$\text{GST (U/mL)} = [(A4-A3)-(A2-A1)] \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V \text{ 反总} \div V \text{ 样} \div T = 0.23 \times [(A4-A3)-(A2-A1)]$$

ε：产物摩尔消光系数，9.6×10³ L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；10⁶：单位换算系数，1mol=1×10⁶μmol；V 反总：反应体系总体积，1100μL=0.0011 L；Cpr：上清液蛋白质浓度（mg/mL），需要另外测定；V 样：加入反应体系中上清液体积，100μL=0.1 mL；T：反应时间，5min；W：样本质量，g；V 样总：试剂一体积，1 mL；细胞数量：以 10⁴ 为单位，万。

注意事项：

1. 样本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. 若样本测定吸光度大于 1，建议对样本用蒸馏水稀释，计算时结果乘以稀释倍数；
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）。

实验实例：

- 1、取 0.1g 月季加入 1mL 试剂一进行冰浴匀浆，8000g，4°C 离心 10min，取上清，稀释 50 倍置冰上待测，按照测定步骤操作，测得计算 ΔA 测定管=A4-A3=0.647-0.587=0.06，ΔA 空白管=A2-A1=0.591-0.539=0.052，按样本质量计算得：

$$\text{GST (U/g 质量)} = 0.23 \times [(A4-A3)-(A2-A1)] \div W \times 50 \text{ (稀释倍数)} = 0.92 \text{ U/g 质量。}$$

2、取 0.1g 肝加入 1mL 试剂一进行冰浴匀浆，8000g，4℃离心 10min，取上清，稀释 500 倍置冰上待测，按照测定步骤操作，测得计算 ΔA 测定管= $A_4-A_3=0.824-0.543=0.281$ ， ΔA 空白管= $A_2-A_1=0.591-0.539=0.052$ ，按样本质量计算得：

$GST(U/g \text{ 质量})=0.23 \times [(A_4-A_3)-(A_2-A_1)] \div W \times 500$ （稀释倍数）= $263.35 U/g \text{ 质量}$ 。

相关发表文献：

[1] Wensu Han, Yemeng Yang, Jinglin Gao, et al. Chronic toxicity and biochemical response of *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae) exposed to acetamiprid and propiconazole alone or combined. *Ecotoxicology*. May 2019;28(4):399-411.(IF2.46)

[2] Zhi Zhou, Xiaopeng Yua, Jia Tang, et al. Systemic response of the stony coral *Pocillopora damicornis* against acute cadmium stress. *Aquatic Toxicology*. January 2018;(IF3.794)

[3] Le Guan, Muhammad Salman Haider, Nadeem Khan, et al. Transcriptome Sequence Analysis Elaborates a Complex Defensive Mechanism of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) in Response to Salt Stress. *International Journal of Molecular Sciences*. December 2018;(IF4.183)

[4] Xing Wei, Xuejun Mo, Faliang An, et al. 2',4'-Dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone, a potent Nrf2/ARE pathway inhibitor, reverses drug resistance by decreasing glutathione synthesis and drug efflux in BEL-7402/5-FU cells. *Food and Chemical Toxicology*. September 2018;(IF3.775)

[5] Qiuli OuYang, Nengguo Tao, Miaoling Zhang. A Damaged Oxidative Phosphorylation Mechanism Is Involved in the Antifungal Activity of Citral against *Penicillium digitatum*. *Frontier in Immunology*. February 2018;(IF4.259)

[6] Chunsheng Li, Xianqing Yang, Ying Xu, et al. Cadmium detoxification induced by salt stress improves cadmium tolerance of multi-stress-tolerant *Pichia kudriavzevii*. *Environmental Pollution*. November 2018;(IF5.714)

[7] Xiao Hui Xu, Yinghui Guo, Hongwei Sun, et al. Effects of Phytase Transgenic Maize on the Physiological and Biochemical Responses and the Gut Microflora Functional Diversity of *Ostrinia furnacalis*. *Scientific Reports*. March 2018;(IF4.011)