

谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 活性检测试剂盒说明书

微量法

货号: AC10137

规格: 100T/96S

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 100 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	液体 22 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 2 mL 蒸馏水溶解。

产品说明:

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。

自备仪器和用品:

低温离心机、水浴锅、可调节移液器、紫外-可见分光光度计/酶标仪、研钵/匀浆器、微量石英比色皿/96 孔 UV 板和蒸馏水。

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/酶标仪预热 30 min 以上, 调节波长到 340nm, 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: 取微量石英比色皿, 加入 20 μ L 试剂一, 180 μ L 试剂二和 20 μ L 试剂三, 迅速混匀后于 340nm 测定 10s 吸光度记 A1, 在 25 $^{\circ}$ C (一般物种) 或者 37 $^{\circ}$ C (哺乳动物) 水浴 5min 后, 快速取出测定吸光度记 A2。

4. 测定管: 取微量石英比色皿, 加入 20 μ L 上清液, 180 μ L 试剂二和 20 μ L 试剂三, 迅速混匀后于 340nm 测定 10s 吸光度记 A3, 25 $^{\circ}$ C (一般物种) 或者 37 $^{\circ}$ 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

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 $^{\circ}$ C 或者 37 $^{\circ}$ C 中, 每毫克蛋白每分钟催化 1 μ mol 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 $^{\circ}$ C 或者 37 $^{\circ}$ C 中, 每克样本每分钟催化 1 μ mol CDNB 与 GSH 结合为一个酶活性单位。

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

3、按细胞数量计算

活性单位定义: 在 25 $^{\circ}$ C 或者 37 $^{\circ}$ C 中, 每 10⁴ 个细胞每分钟催化 1 μ mol CDNB 与 GSH 结合为一个酶活单位。

$$\text{GST (U/10}^4 \text{ cell)} = [(A4-A3)-(A2-A1)] \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V \text{ 反总} \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 0.23 \times [(A4-A3)-(A2-A1)] \div 500$$

4、按液体体积计算

活性单位定义: 在 25 $^{\circ}$ C 或者 37 $^{\circ}$ C 中, 每毫升液体每分钟催化 1 μ mol 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 $\times 10^3$ L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; 10⁶: 单位换算系数, 1mol=1 $\times 10^6$ μ mol; V 反总: 反应体系总体积, 220 μ L=2.2 $\times 10^{-4}$ L; Cpr: 上清液蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定; W: 样本质量, g; V 样: 加入反应体系中上清液体积, 20 μ L=0.02mL; V 样总: 试剂一体积, 1mL; T: 反应时间, 5min; 500: 细胞数量, 500 万。

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 $^{\circ}$ C 或者 37 $^{\circ}$ C 中, 每毫克蛋白每分钟催化 1 μ mol CDNB 与 GSH 结合为一个酶活性单位。

$$\text{GST (U/mg prot)} = [(A4-A3)-(A2-A1)] \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V \text{ 反总} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T = 0.38 \times [(A4-A3)-(A2-A1)] \div \text{Cpr}$$

2、按样本质量计算

活性单位定义: 在 25 $^{\circ}$ C 或者 37 $^{\circ}$ C 中, 每克样本每分钟催化 1 μ mol CDNB 与 GSH 结合为一个酶活性单位。

$$\text{GST (U/g 质量)} = [(A4-A3)-(A2-A1)] \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T = 0.38 \times [(A4-A3)-(A2-A1)] \div W$$

3、按细胞数量计算

活性单位定义: 在 25 $^{\circ}$ C 或者 37 $^{\circ}$ C 中, 每 10⁴ 个细胞每分钟催化 1 μ mol CDNB 与 GSH 结合为一个酶活单位。

$$\text{GST (U/10}^4 \text{ cell)} = [(A4-A3)-(A2-A1)] \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V \text{ 反总} \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 0.38 \times [(A4-A3)-(A2-A1)] \div 500$$

4、按液体体积计算

活性单位定义: 在 25 $^{\circ}$ C 或者 37 $^{\circ}$ C 中, 每毫升液体每分钟催化 1 μ mol CDNB 与 GSH 结合为一个酶活单位。

$$\text{GST (U/mL)} = [(A4-A3)-(A2-A1)] \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V \text{ 反总} \div V \text{ 样} \div T = 0.38 \times [(A4-A3)-(A2-A1)]$$

ϵ : 产物摩尔消光系数, 9.6 $\times 10^3$ L/mol/cm; d: 96 孔板光径, 0.6cm; 10⁶: 单位换算系数, 1mol=1 $\times 10^6$ μ mol; V 反总: 反应体系总体积, 220 μ L=2.2 $\times 10^{-4}$ L; Cpr: 上清液蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定; W: 样本质量, g; V 样: 加入反应体系中上清液体积, 20 μ L=0.02mL; V 样总: 加入试剂一体积, 1 mL; T: 反应时间, 5min; 500: 细胞数量, 500 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, 使用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定管 = $A_4 - A_3 = 0.7046 - 0.62 = 0.0846$, ΔA 空白管 = $A_2 - A_1 = 0.5902 - 0.5207 = 0.0695$, 按样本质量计算得:
$$\text{GST (U/g 质量)} = 0.23 \times [(A_4 - A_3) - (A_2 - A_1)] \div W \times 50 \text{ (稀释倍数)} = 1.737 \text{ U/g 质量。}$$
- 2、取 0.1g 肺加入 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, 使用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定管 = $A_4 - A_3 = 0.9402 - 0.5059 = 0.4343$, ΔA 空白管 = $A_2 - A_1 = 0.5902 - 0.5207 = 0.0695$, 按样本质量计算得:
$$\text{GST (U/g 质量)} = 0.23 \times [(A_4 - A_3) - (A_2 - A_1)] \div W \times 50 \text{ (稀释倍数)} = 41.952 \text{ U/g 质量。}$$

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] 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)
- [3] 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)
- [4] 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)
- [5] 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)
- [6] 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)