

谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferase, GST) 试剂盒说明书
(紫外法 48 样)

一、产品简介:

谷胱甘肽转移酶 (GST; EC 2.5.1.18) 是一种具有多种生理功能的蛋白质家族, 清除潜在毒性化合物, 包括由氧化应激产生的物质, 是细胞防御机制的一部分。

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。

二、试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂一	液体 25mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂二	液体 2.5mL×1 瓶	4℃ 保存

【注】：反应 mix 的制备 (现配现用)：按照试剂一：试剂二：提取液=10:1:9 的比例混匀。

若一次性用完即：25mL 试剂一+2.5mL 试剂二+22.5mL 提取液, 充分混匀即得反应 mix。

三、所需仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿(光径 1cm)、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、蒸馏水。

四、谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 活性检测:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织(水分充足的果实样本可以取 0.2g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】：若增加样本量, 可按照组织质量 (g) : 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一; 冰浴超声波破碎细菌或细胞 (功率 300w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min); 12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。(或按照细菌或细胞数量 (10⁴ 个): 试剂一体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取)

【注】：不能用细胞裂解液处理细胞。

③ 液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 紫外分光光度计预热 30 min, 温度设定 37℃, 调节波长到 340 nm, 蒸馏水调零。

② 可先做 2 个样本预测定, 熟悉操作过程, 并依据测出的吸光值 A 是否符合预判做相应调整。

③ 在 1 mL 比色杯孔板中依次按照下表加入试剂:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	50
反应 mix	950
混匀, 37℃下, 立即于 340nm 下读取 A1 值, 10min 后读取 A2 值。ΔA=A2-A1。	

【注】：1. 若ΔA 过小, 可以延长反应时间 (如: 15min 或更长), 或增加样本加样体系 (如 20μL, 则反应 mix 相应增加), 则改变后的反应时间 T 和加样体积 V1 需代入计算公式重新计算。

2. 若 A2 大于 1.5, 可以缩短反应时间 (如 2min), 或减少样本加样体系 (如 5μL, 则反应 mix

相应增加)，则改变后的反应时间 T 和加样体积 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按蛋白浓度计算

活性单位定义：在上述反应条件下，每毫克蛋白每分钟催化 1nmol 的 CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

$$\text{GST (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T = 416.7 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本质量计算

活性单位定义：在上述反应条件下，每克样品每分钟催化 1nmol/L CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

$$\text{GST (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 416.7 \times \Delta A \div W$$

3、按细胞数量计算

活性单位定义：在上述反应条件下，每 10⁴ 个细胞每分钟催化 1nmol/L CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

$$\text{GST (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) \div T = 416.7 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

4、按液体体积计算

活性单位定义：在上述反应条件下，每毫升液体每分钟催化 1nmol/L CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

$$\text{GST (nmol/min/mL)} = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 416.7 \times \Delta A$$

ε---产物摩尔消光系数，9.6×10³ L/mol /cm；

d---比色皿光径，1cm；

V2---反应体系总体积，1000μL=1×10⁻³ L；

V1---加入反应体系中上清液体积，50μL=0.05

mL； V---加入提取液体积，1mL； T---反应时间

(min)， 5min； W---样本质量， g；

Cpr---上清液蛋白质浓度 (mg/mL)， 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。