

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

(货号: G0208F 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	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	粉体×3 瓶	-20°C 保存	每瓶临用前甩几下使粉体落入底部, 外加 8.5mL 提取液溶解, 可分装保存至 -20°C, 一个月内用完。
试剂二	液体 2.5mL×1 瓶	4°C 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。

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°C 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°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。(或按照细菌或细胞数量 (10^4 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°C, 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 (μ L)	测定管
样本	50
反应 mix	950
混匀, 37°C 下, 立即于 340nm 下读取 A1 值, 10min 后读取 A2 值。 $\Delta A = A2 - A1$ 。	

- 【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 V_1 (如增至 100 μ L, 则反应 mix 相应减少), 则改变后的反应时间 T 和加样体积 V_1 需代入计算公式重新计算。
2. 若 A_2 大于 1.5, 可以缩短反应时间 (如 2min), 或减少样本加样体系 V_1 (如减至 25 μ L, 则反应 mix 相应增加), 则改变后的反应时间 T 和加样体积 V_1 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。

$$\text{GST}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \div \epsilon \div d \times V_2 \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_1) \div T = 208.4 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{GST}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \div \epsilon \div d \times V_2 \times 10^9] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 208.4 \times \Delta A \div W$$

3、按细胞数量计算:

活性单位定义: 在上述反应条件下, 每 10^4 个细胞每分钟催化 1nmol/L CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

$$\text{GST}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \div \epsilon \div d \times V_2 \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V_1 \div V) \div T = 208.4 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

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。

$$\text{GST}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL})=[\Delta A \div \epsilon \div d \times V_2 \times 10^9] \div V_1 \div T = 208.4 \times \Delta A$$

ϵ ---产物摩尔消光系数, $9.6 \times 10^3 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$;

d ---比色皿光径, 1cm;

V ---加入提取液体积, 1mL;

V_1 ---样本加样体积, $50\mu\text{L}=0.05 \text{ mL}$;

V_2 ---反应体系总体积, $1000\mu\text{L}=1 \times 10^{-3} \text{ L}$;

T ---反应时间, 10min;

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。