

# 谷胱甘肽—S 转移酶测定试剂盒说明书

(货号:A004-1-1 Glutathione S-transferase GST 比色法 100管/48样)

**免责声明:** 测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验,否则由此导致的后果用户自行承担!

## 一、测定原理:



GST 具有催化还原型谷胱甘肽 (GSH) 与 1-氯-2,4-二硝基苯 (CDNB 底物) 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、试剂组成与配制:(试剂盒有效期 6 个月)

|   | 试剂组成   | 规格            | 保存条件    |
|---|--|---------------|---------|
| 试剂一   | 甲粉   | 粉剂×1 支        | 2~8℃ 保存 |
|   | 甲液配制:每支粉剂加 1mL 无水乙醇充分溶解,2~8℃ 可保存一个月(颜色变深后弃用) |               |         |
|   | 乙液   | 60mL×1 瓶      | 2~8℃ 保存 |
| 试剂一应用液配制:甲液:乙液=1:59 的比例进行配制,现用现配  |  |               |         |
| 试剂二   | 甲粉   | 粉剂×1 瓶        | 2~8℃ 保存 |
|   | 乙液   | 50mL×1 瓶      | 2~8℃ 保存 |
| 试剂二应用液配制:将甲粉加蒸馏水 172mL,加热至沸腾搅拌充分溶解,再将甲乙两种溶液混合并搅拌均匀,此混合液为过饱和溶液,室温保存。如出现结晶,直接取上清进行实验。 |  |               |         |
| 试剂三   | 白色粉末   | 粉剂×1 瓶        | 2~8℃ 保存 |
| 试剂三应用液配制:加蒸馏水 200mL,常温(或 37℃ 加热)溶解后备用(可用赠送的塑料瓶配制),室温保存。                             |  |               |         |
| 试剂四   | 淡黄色粉末  | 粉剂×1 支        | 2~8℃ 保存 |
| 试剂四应用液配制:加蒸馏水 50mL,常温溶解,避光 2~8℃ 保存。   |  |               |         |
| 试剂五   | GSH 标准品                                      | 3.07mg 粉剂×3 支 | 2~8℃ 保存 |
| 试剂六   | GSH 标准溶剂<br>贮备液                              | 10mL×1 瓶      | 2~8℃ 保存 |
|   | 标准品稀释液配制:按标准溶剂贮备液:蒸馏水=1:9 的比例混合配成,4℃ 保存。     |               |         |
| 1mmol/L GSH 标准溶液配制:取 GSH 标准品粉剂一支加到 10mL 标准品稀释液中混匀溶解,4℃ 可保存 1-2 周。                   |  |               |         |
| 20μmol/LGSH 标准品溶液配制:取 1mmol/L 的 GSH 标准溶液 0.1mL 加试剂二应用液 4.9mL,现用现配。                  |  |               |         |
| 基质液配制:试剂一应用液与 1mmol/LGSH 标准溶液以 1:1 比例混合,现用现配。                                       |  |               |         |

## 三、适用范围:

本试剂盒可用于检测血清、组织、培养细胞等样本。

## 四、所需仪器:

可见分光光度计及 1cm 光径比色皿(或酶标仪(400~415nm)及 96 孔板)、37℃ 恒温水浴箱、电炉、低速离心机、蛋白测定试剂(本公司有售)。

## 五、样本前处理

1、血清或血浆:可以直接使用。

2、组织样本前处理:称取待测动物组织的重量,按重量(g):体积(mL)=1:9 的比例,加入 9 倍体积的生理盐水,低温(0-4℃)条件匀浆,3500 转/分,离心 10 分钟,取上清液待测(制备好的匀浆上清液需要测定其蛋白浓度,蛋白测定试剂盒本公司有售)。

3、细胞样本前处理:(贴壁细胞)用细胞刮配合等渗 PBS 刮下或用胰酶消化下来(消化后加入 0.5-1mL 等渗 PBS 冲洗),再将细胞悬液转移到另一离心管中,1000 转/分,离心 10 分钟,弃上清液,留细胞沉淀;用等渗 PBS 再清洗 1~2 次,同样 1000 转/分,离心 10 分钟,弃上清液,留细胞沉淀(若不立即测定,可直接放-20℃ 或-80℃ 冰箱保存,3 个月内可用);往细胞沉淀中加入 0.2~0.3mL 的匀浆介质(推荐生理盐水)(加完匀浆介质后轻

轻混匀细胞溶液,使其均匀,吸取少量进行细胞计数;若是破碎后可以测蛋白,则不用细胞计数),冰水浴条件下超声破碎(功率:200~300W,3~5 秒/次,间隔 15 秒,重复运行 3~5 分钟)或手动匀浆,制备好的匀浆液若比较均匀可不离心直接测定。也可采用裂解液裂解(推荐 TritonX-100,1~2% 浓度 0.1mL,冰上裂解 30~40 分钟),裂解好的液体可不离心直接测定。[注]:建议细胞数在 100 万个以上(数量越多,测定效果越好)。破碎好的液体可显微镜观察细胞是否破碎完全。

4、制备溶血液:取肝素抗凝全血 20μL,用蒸馏水稀释至 1mL (50 倍稀释),混匀,4℃ 静置 5 分钟后进行测定。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。

## 六、操作步骤:

### (一)、血清(浆)、组织、细胞样本操作:

#### 1、第一步:酶促反应

|                                | 测定管 | 对照管 |
|--------------------------------|-----|-----|
| 基质液(mL)                        | 0.3 | 0.3 |
| 样本(mL)                         | 0.1 |     |
| 混匀,37℃ 水浴 30 分钟                |     |     |
| 试剂二应用液(mL)                     | 2   | 2   |
| 样本(mL)                         |     | 0.1 |
| 混匀,4000 转/分,离心 10 分钟,取上清液作显色反应 |     |     |

#### 2、第二步:显色反应:

|   | 空白管 | 标准管 | 测定管 | 对照管 |
|---|-----|-----|-----|-----|
| 试剂二应用液(mL)  | 2   |     |     |     |
| 20μmol/LGSH 标准溶液(mL)  |     | 2   |     |     |
| 上清液(mL)   |     |     | 2   | 2   |
| 试剂三应用液(mL)  | 2   | 2   | 2   | 2   |
| 试剂四应用液(mL)  | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| 混匀,室温放置 15 分钟,1cm 光径,蒸馏水调零波长 412nm 处分光光度计读取各管吸光值 A (或是每管吸取 200μL 反应液,加到 96 孔板中,酶标仪 412nm 处读数) |     |     |     |     |

**注意:** A<sub>对照</sub> - A<sub>测定</sub> 值大于 0.2 (分光光度计测得值) 时,将样本稀释后再测,或是预先做好预试,将 A<sub>对照</sub> - A<sub>测定</sub> 值控制在 0.1~0.2 之间(酶标仪读数可在 0.1 左右,酶活力较低时该值大于 0.02 即可)。

#### 3、单位定义和计算公式

**血清(浆)等液体样本单位定义:** 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 U。

**血清(浆)等液体样本计算公式:**

$$\text{GST 活力 (U/mL)} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N \div T \div V_{\text{样}} \times N_{\text{样}}$$

**组织、细胞样本单位定义:** 每毫克组织蛋白对应的酶量在 37℃ 每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 U。

**组织、细胞样本计算公式:**

$$\text{GST 活力 (U/mg 蛋白)} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N \div T \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}})$$

上述公式中:

C<sub>标准</sub>: 标准品浓度, 20μmol/L;  
N: 反应体系稀释倍数, 6 (2.4mL / 0.4mL, 固定值);  
T: 酶促反应时间, 30 分钟;  
V<sub>样</sub>: 样本取样量, 0.1mL;  
N<sub>样</sub>: 样本测试前稀释倍数。  
C<sub>pr</sub>: 组织匀浆蛋白浓度, mg/mL;

**(二)、溶血液（全血 1：49 加蒸馏水）样本操作：****1、第一步：酶促反应**

|                                |     |     |
|--------------------------------|-----|-----|
|                                | 测定管 | 对照管 |
| 基质液(mL)                        | 0.2 | 0.2 |
| 待测溶血液(mL)                      | 0.2 |     |
| 混匀，37℃水浴 30 分钟                 |     |     |
| 试剂二应用液(mL)                     | 2   | 2   |
| 待测溶血液(mL)                      |     | 0.2 |
| 混匀，4000 转/分，离心 10 分钟，取上清液作显色反应 |     |     |

**2、第二步：显色反应**

|   |     |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|-----|
|   | 空白管 | 标准管 | 测定管 | 对照管 |
| 试剂二应用液(mL)  | 2   |     |     |     |
| 20μmol/LGSH 标准溶液(mL)  |     | 2   |     |     |
| 上清液 (mL)  |     |     | 2   | 2   |
| 试剂三应用液 mL)  | 2   | 2   | 2   | 2   |
| 试剂四应用液(mL)  | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| 混匀室温放置 15 分钟，1cm 光径，蒸馏水调零波长 412nm 处分光光度计读取各管吸光值 A（或是每管吸取 200μL 反应液，加到 96 孔板中，酶标仪 412nm 处读数） |     |     |     |     |

**3、单位定义和计算公式**

**单位定义：**每毫升全血在 37℃每分钟，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 U。

**计算公式：**

$$\text{全血中 GST 活力 (U/mL)} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N \div T \div V_{\text{全血}}$$

**V<sub>全血</sub>：**50 倍稀释溶血液取 0.2mL 进行测定相当于取全血 0.004mL(0.2mL ÷ 50 = 0.004mL)；

**C<sub>标准</sub>：**标准品浓度，20μmol/L；

**N：**反应体系稀释倍数，6 (2.4mL / 0.4mL，固定值)；

**T：**酶促反应时间，30 分钟；

**七、测定意义：**

谷胱甘肽 S—转移酶 (glutathione S—transferase GST) 是一类与肝脏解毒有关的酶，在肝细胞中存在量很大，所以当肝细胞受损害时，GSH-ST 常常很早释放到血中，血中 GSH-ST 的升高常常早于谷丙转氨酶 (SGPT) 和谷草转氨酶 (SGOT)，因而 GSH-ST 的升高可作为肝脏损伤的敏感指标。

谷胱甘肽 S—转移酶广泛存在于哺乳动物各组织中，催化谷胱甘肽 (GSH) 与化学物质的亲电子基团结合，最终形

成硫醚氨酸排出体外，在体内解毒功能上起重要作用。

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 (GSH-PX) 活力低下的条件下，只有清除体内脂质过氧化物 (LPO) 的功能。

**八、注意事项：**

- 1、试剂二甲粉配制时最好是直接加热的方式溶解，水浴或烘箱等间接加热方式可能无法使其溶解。
- 2、肝素抗凝全血放置冰箱存放时间不可超过 3 天，血浆、组织块放 -20℃ 可保存一个月以上。
- 3、上清液当天提取，当天测试。
- 4、其它样品前处理可参照本公司官网“技术支持”里的“技术文章”。
- 5、本试剂盒仅用于科研、实验室。