

# 谷草转氨酶（AST/GOT）测试盒说明书

（货号 C010-2-1 微板法 96T）

**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：

AST/GOT 能使 $\alpha$ -酮戊二酸和天门冬氨酸移换氨基和酮基，生成谷氨酸和草酰乙酸。草酰乙酸在反应过程中可自行脱羧成丙酮酸。丙酮酸与 2,4-二硝基苯肼反应生成 2,4-二硝基苯腙，在碱性溶液中显红棕色。比色后，查标准曲线，可求得酶的活力单位。

## 二、试剂组成与配制：（试剂盒有效期 6 个月）

**试剂一：**基质液，5mL×1 瓶，4℃保存。

**试剂二：**显色剂，5mL×1 瓶，4℃保存。

**试剂三：**浓缩终止剂，5mL×1 瓶，室温密封保存；临用时加蒸馏水 10 倍（1:9）稀释配成**终止剂**，室温密封保存。

**试剂四：**丙酮酸钠标准液 1mL×1 支，4℃保存。

**试剂五：**磷酸盐缓冲液 1mL×1 支，4℃保存。

## 三、所需仪器及试剂：

酶标仪（505nm）及 96 孔板（附送一块），37℃水浴锅或恒温箱，蒸馏水，蛋白测定试剂（组织及细胞样本用，本公司有售）。

## 四、操作过程：

### 1、样本前处理：

①、**血清（浆）、细胞培养液等液体样本：**直接使用（若有固体物存在，可 4000 转/分，离心 10 分钟，取上清液用）。

②、**组织样本：**称取组织重量，按重量(g):体积(mL)=1:9 的比例，加入 9 倍体积的生理盐水，冰水浴条件下匀浆，制成 10%的组织匀浆，4000 转/分，离心 10 分钟，取上清液用生理盐水稀释到适宜浓度（通过标准曲线计算得匀浆液卡门氏单位值小于 150）待测。（另取部分上清液测其蛋白浓度，蛋白定量试剂盒本公司有售）

③、**培养细胞样本前处理：**将收集好的细胞用等渗缓冲液（推荐用 0.01mol/L pH7~7.4 磷酸盐缓冲液或生理盐水）清洗 1~2 次；1000 转/分，离心 10 分钟，弃上清，留细胞沉淀，加入匀浆介质（推荐加入 0.01mol/L pH7~7.4 的磷酸盐缓冲液或生理盐水），冰水浴条件下超声破碎或手动匀浆，制备好的匀浆液 4000 转/分，离心 10 分钟，取上清待测（上清液取部分测其蛋白浓度，蛋白测定试剂盒本公司有售；或者在细胞破碎前进行细胞计数，可不测蛋白）。

2、**操作步骤：**（试剂一提前 5 分钟 37℃预温；酶标仪提前至少 30 分钟开机预热，调整波长至 505nm 备用；终止剂可提前配好，室温密封保存）

①、**标准曲线制作：**参考附录 I。（标准曲线制作可与样本测定分开进行）

②、**样本预试准备：**（样本正式实验前最好取 1~2 例，分别进行不同倍数稀释（血清（浆）、细胞匀浆等样本推荐用原液、2 倍、5 倍、10 倍稀释，肝组织匀浆推荐用 10 倍、20 倍、40 倍、80 倍稀释）做预试，预试结果以各稀释倍数下的绝对 OD 值代入标准曲线计算后得到的卡门氏单位值在 50~100 间为宜；样本若是不稀释时结果小于 50 卡门氏单位，则用样本

原液进行操作；但若是结果过低甚至出现负值，则需考虑样本酶活性过低问题，可延长第一步 37℃反应时间（如 60 分钟或 120 分钟等）或增加样本上样量改善。

## ③、操作表：

	测定孔	对照孔
待测样本（ $\mu$ L）	5	
试剂一（ $\mu$ L）37℃已预温	20	20
轻轻震荡孔板混匀，37℃反应 30 分钟		
试剂二（ $\mu$ L）	20	20
待测样本（ $\mu$ L）		5
轻轻震荡孔板混匀，37℃反应 20 分钟		
终止剂（ $\mu$ L）	200	200
轻轻震荡孔板混匀，室温放置 15 分钟，波长 505nm，酶标仪测定各孔 OD 值（A），以绝对 OD 值（A 测定-A 对照）代入标准曲线，求得相应的 AST/GOT 活力值（卡门氏单位）。		

**注：**测定孔与对照孔中加的样本为同一份样本，亦即每个样本都需做一个测定孔和一个对照孔。

## 五、计算：

### 1、血清（浆）、细胞培养液等液体样本计算方法：

$$\text{AST 活力 (U/L)} = \frac{\text{代入标曲计算得活力值 (卡门氏单位)}}{\text{值 (卡门氏单位)}} \times 0.482 \times N$$

### 2、组织（或细胞）样本按蛋白计算方法：

$$\text{AST 活力 (U/g 蛋白)} = \frac{\text{代入标曲计算得活力值 (卡门氏单位)}}{\text{值 (卡门氏单位)}} \times 0.482 \times N \div \text{Cpr}$$

### 3、细胞样本按细胞数量计算方法：

$$\text{AST 活力 (U/10}^4 \text{个细胞)} = \frac{\text{代入标曲计算得活力值 (卡门氏单位)}}{\text{值 (卡门氏单位)}} \times 0.482 \times N \div \frac{\text{细胞数}}{V_{\text{样总}}}$$

以上公式中：

**0.482：**卡门氏单位到 U/L 的换算；

**N：**样本测试前的稀释倍数（组织、细胞样本不包含匀浆过程）；

**Cpr：**组织匀浆蛋白浓度，g/L；

**细胞数：**细胞在匀浆破碎时的总数量， $10^4$  个；

**$V_{\text{样总}}$ ：**细胞匀浆时加入的匀浆介质总体积，L。

## 七、注意事项：

- 比色法中常用的有赖氏（Reitman-Frankel）法及金氏（King）法。赖氏法标准曲线所定单位数，是用实验方法和卡门氏分光光度法（速率法）作对比测定求得的。以卡门氏单位报告结果，比较准确。
- 一般血清标本内源性酮酸很少，血清对照孔吸光度值相近。可将一般血清的对照孔（或称标本空白孔）的吸光度作为日常质控的指标之一；如相差大，可考虑 $\alpha$ -酮戊二酸浓度、DNPH 浓度及仪器等原因引起。
- 样本在测定完将绝对 OD 值代入标曲计算后酶活力超过 150 卡门氏单位时，需用生理盐水稀释后重测（推荐先做预试，确定好稀释倍数后再进行正式实验）。
- 血清中 AST 在室温（25℃）可保存 2 天，在 0~4℃可保存一周，在-25℃可保存 1 个月。
- 试剂一提前 5-10 分钟置于 37℃预温。
- 标准曲线每盒试剂至少做一次。

- 7、卡门氏单位定义：1mL 液体，反应液总容量 3mL，波长 340nm，1cm 光径，25℃，1min 内所生成的丙酮酸，使 NADH 氧化成 NAD<sup>+</sup>而引起吸光度每下降 0.001 为一个单位（1 卡门氏单位=0.482 U/L，25℃）。
- 8、试剂四丙酮酸钠标准品浓度为 2μmol/mL，做标曲时直接使用即可。

### 附录 I：AST/GOT 标准曲线制作

#### 1、操作表：

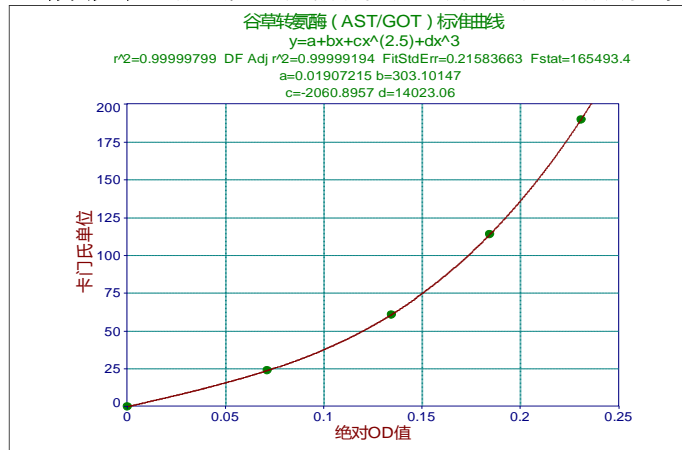
孔号	S0	S1	S2	S3	S4
试剂五 (μL)	5	5	5	5	5
试剂四丙酮酸钠标准液 (μL)	0	2	4	6	8
试剂一 (μL)	20	18	16	14	12
试剂二 (μL)	20	20	20	20	20
轻轻震荡孔板混匀,37℃反应 20 分钟					
终止剂 (μL)	200	200	200	200	200

轻轻震荡孔板混匀，室温放置 15 分钟，波长 505nm，酶标仪测定各孔 OD 值，计算绝对 OD 值 (ΔA) = A (S) - A (S<sub>0</sub>)，以绝对 OD 值作为横坐标，相应的卡门氏单位为纵坐标，作坐标图拟合公式，可在 Excel 表中用公式计算样本中的 AST/GOT 酶活力卡门氏单位值。

#### 2、测定结果(附参考标准曲线)

孔号	S0	S1	S2	S3	S4
酶活力卡门氏单位值	0	24	61	114	190
测得各标准孔 OD 值	0.2272	0.2985	0.3616	0.4117	0.4582
绝对 OD 值 (ΔA)	0	0.0713	0.1344	0.1845	0.2310

#### 3、作图如下：(标曲拟合公式有很多种，下面选择一种作为参考)



**【注】：**标准曲线需要客户自己制作才更准确，操作步骤参照上表；上表所列的卡门氏单位数值与各标准孔的标准品加入量是对应的，所以该值固定不变，客户可以由此值和自己按操作表操作测得的各标准孔的绝对 OD 值作多项式曲线 ( $R^2 \geq 0.99$ )，得到计算公式用于样本计算。