

谷草转氨酶（AST） 检测试剂盒微板法

使用说明书

产品货号：BP10019W

注意：请在试剂盒保质期内使用，具体保质期见外包装标签。

本产品仅供科学研究使用，不能用于临床诊断。

检测范围：0.75-72.3IU/L

灵敏度：0.75IU/L

有效期：6个月

保存温度：2-8℃

检测原理:

谷草转氨酶（AST）催化天冬氨酸与 α -酮戊二酸之间的氨基转换反应，生成草酰乙酸和谷氨酸，反应时间过后，加入苯肼，与丙酮酸生成苯腙，苯腙在碱性条件下呈红棕色。在 505nm 比读吸光度并计算酶活力。本试剂盒检测组织或细胞时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法。

注意事项:

1. 不能使用过期产品，不同货号 and 批号组分不得混用。
2. 本试剂开封后请尽快使用，以免空气、采样污染引起试剂变质。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 如果可能传播疾病，所有的样品都应管理好，按照规定的程序处理样品和检测装置。
5. 试剂严格按保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。试剂盒中如有提供粉剂，使用前请甩几下，使粉剂落入底部。

试剂盒组分：

| 试剂名称 | 规格（48T/21S） | 规格（96T/45S） | 保存条件 |
|------|-------------|-------------|------|
| 提取液 | 50mL×1 瓶 | 100mL×1 瓶 | 2-8℃ |
| 试剂一 | 1mL×1 瓶 | 2mL×1 瓶 | 2-8℃ |
| 试剂二 | 1mL×1 瓶 | 2mL×1 瓶 | 2-8℃ |
| 试剂三 | 10mL×1 瓶 | 20mL×1 瓶 | 2-8℃ |
| 标准品 | 粉剂×1 瓶 | 粉剂×2 瓶 | 2-8℃ |

所需仪器耗材及试剂：

离心机、酶标仪、可调式移液器、蒸馏水、恒温箱。

样本处理及要求:

1. **试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围**, 建议实验前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定, 根据预实验的结果, 结合本试剂盒的线性范围: 0.75-72.3IU/L, 如果样品中待测物浓度过高或过低, 请对样本做适当的稀释或浓缩, 样本的稀释液为提取液。
2. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中, 建议做预实验验证其检测有效性。
3. **组织样本**: 按照组织质量(g): 提取液体积(mL)为 1:5~10 的比例 (建议约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液) 进行冰浴匀浆, 离心机 4℃, 10000 g, 10 min, 取上清, 置冰上待测。部分上清样本用于蛋白浓度测定。
4. **血清 (浆) 等液体样本**: 直接测定。若浑浊, 则离心后取上清测定。
5. **细胞/细菌样本**: 按照细菌或细胞数量(10^4 个): 提取液体积(mL)为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液), 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 10000 g, 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。部分上清样本用于蛋白浓度测定。

检测前准备工作:

1. 请提前取出试剂盒，平衡至室温。
2. **标准品溶液的配制:** 取一瓶标准品加 1mL 蒸馏水混匀为 20mmol/L 标准品，稀释 10 倍后使用，即取 20mmol/L 标准品 0.1mL 加 0.9mL 蒸馏水混匀为 2mmol/L 标准品。

操作步骤:

1. 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 505nm。
2. 试剂一 37℃ 预温 10min。
3. 标准曲线（在 96 孔板中依次加入）

| 编号 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|
| 提取液 (μL) | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 2mmol/L 标准品 (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 20min | | | | | |
| 试剂三 (μL) | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 |
| 酶标仪震板 10s 混匀，室温放置 15min，波长 505nm，酶标仪测定各孔吸光值，各孔 OD 值减去零孔 OD 值，所得差值=绝对 OD 值作为横坐标，以 0、24、61、114、190 卡门氏单位为纵坐标，绘制二次函数曲线。 | | | | | |

4. 样本测定（在 96 孔板中依次加入）：

| 试剂名称(μ L) | 测定孔 | 对照孔 |
|---|-----|-----|
| 试剂一（37℃预温 10min） | 20 | 20 |
| 样本 | 5 | |
| 测定孔加入一个样本，都需将吸嘴伸入板孔液体中吸打混匀，37℃孵育 30min。 | | |
| 试剂二 | 20 | 20 |
| 样本 | | 5 |
| 对照孔加入一个样本，都需将吸嘴伸入板孔液体中吸打混匀，37℃孵育 20min | | |
| 试剂三 | 200 | 200 |
| 混匀，室温放置 15min，在 505nm 波长处测各孔 OD 值。 | | |

注：每个测定孔设置一个对照孔。

实验结果结算：

1. 标准品拟合曲线： $y=ax^2+bx+c$ 。

2. 卡门氏单位定义：

25℃，1mL 液体，反应液总量 3mL，波长 340nm，1cm 光径，1min 内所生成的丙酮酸，使 NADH 氧化成 NAD^+ 而引起 OD 值下降 0.001 为一个单位。

(1 卡门氏单位=0.482IU/L，25℃)

3. 国际单位定义：

25℃条件下，每分钟催化 $1 \mu\text{mol}$ NADH 减少量所需的酶量为一个单位。

AST 含量 (IU/L) $= (a \times \Delta A^2 + b \times \Delta A + c) \times 0.482 \text{IU/L}^* \times N$

4. 细胞、组织中 AST 浓度计算公式：

AST 含量 (IU/gprot) $= (a \times \Delta A^2 + b \times \Delta A + c) \times 0.482 \text{IU/L}^* \times N \div \text{Cpr}$

注：

y: 卡门氏单位 (0、24、61、114、190)

x: 标准品 OD 值-空白 OD 值 (卡门氏单位为 0 时的 OD 值)

a,b,c: 拟合曲线相应的常数

ΔA : 样本的绝对 OD 值 (样本测定 OD 值-样本对照 OD 值)

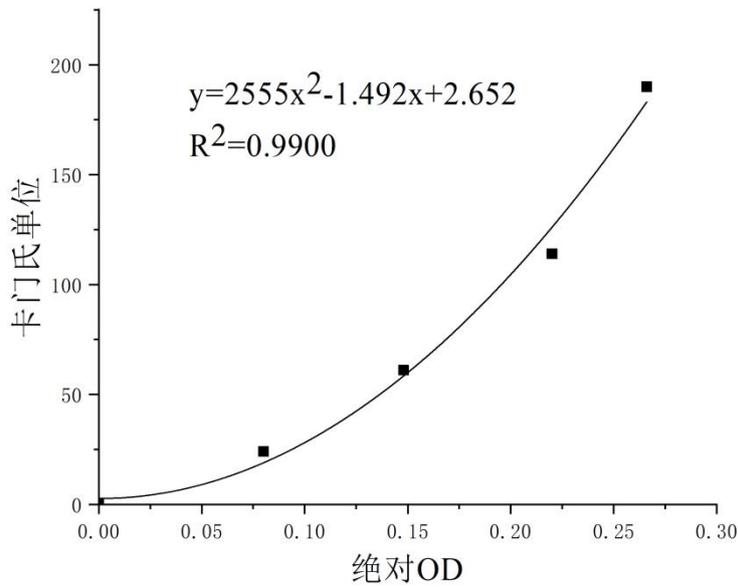
N: 样本稀释倍数

*: 25℃条件下，一卡门氏单位=0.482IU/L

Cpr: 组织样本蛋白浓度，gprot/L

参考曲线:

$y=2555x^2-1.492x+2.652$, $R^2=0.9900$, x 是标准品的绝对 OD 值,y 是卡门氏单位。



注意：本图仅供参考，应以每次实验数据所绘制标准曲线计算样本含量。