

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

（货号：BP10221W 微板法 96 样 有效期：6 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 125mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体 3 瓶	-20℃保存	每瓶： 1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 4mL 提取液溶解，可分装保存至-20℃，一个月内用完。
试剂二	液体 1.5mL×1 支	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。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

① 组织样本：

称取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 0.2g），加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm 4℃ 离心 15min，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 提取液；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 15min，取上清，置冰上待测。（或按照细菌或细胞数量（10⁴ 个）：试剂一（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、检测步骤：

① 酶标仪预热 30 min，温度设定 37℃，调节波长到 340 nm。

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 96 孔板中依次按照下表加入试剂：

试剂组分（μL）	测定管
样本	10
反应 mix	190

混匀，37℃下，立即于 340nm 下读取 A1 值，5min 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 V1（如增至 20 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 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 V1（如减至 5 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 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。

$$\text{GST}(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T = 833.3 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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 的 CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

$$\text{GST}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 833.3 \times \Delta A \div W$$

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 的 CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

$$\text{GST}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) \div T = 833.3 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

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 的 CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

$$\text{GST}(\text{nmol/min/mL}) = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 833.3 \times \Delta A$$

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

d---96 孔板光径，0.5cm；

V---提取液体积，1 mL；

V1---样本加样体积，10 μ L=0.01 mL；

V2---反应体系总体积，200 μ L=2 $\times 10^{-4}$ L；

T---反应时间，5min；

W---样品质量，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。