

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

微量法 100T/96S

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

GST 是一种具有多种生理功能的蛋白质家族，主要存在于细胞质内。GST 是体内解毒酶系统的重要组成部分，主要催化各种化学物质及其代谢产物与 GSH 的巯基共价结合，使亲电化合物变为亲水物质，易于从胆汁或尿液中排泄，达到将体内各种潜在或具备毒性的物质降解并排出体外的目的。因此，GST 在保护细胞免受亲电子化合物的损伤中发挥着重要的生物学功能。此外，因为 GST 具有 GSH-Px 活性，亦称为 non-Se GSH-Px，具有修复氧化破坏的大分子如 DNA、蛋白质等的功能。注意，GST 催化的反应减少 GSH 含量，但是不增加 GSSG 含量。

测定原理：

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。

自备仪器和用品：

低温离心机、水浴锅、可调节移液器、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、和蒸馏水。

试剂组成和配置：

试剂一：液体 120mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 22mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加 2 mL 蒸馏水溶解。

粗酶液提取：

1. 组织：按照组织质量 (g)：试剂一体积 (mL) 为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一）进行冰浴匀浆。8000g，4℃ 离心 10min，取上清置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量 (10⁴ 个)：试剂一体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；然后 8000g，4℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。
3. 血清等液体：直接测定。

测定：

1. 分光光度计/酶标仪预热 30 min，调节波长到 340 nm，用蒸馏水调零。
2. 试剂三放在 25℃（一般物种）或者 37℃（哺乳动物）保温。
3. **测定管：**取微量石英比色皿或 96 孔板，加入 20μL 上清液，180μL 试剂二和 20μL 试剂三，迅速混匀后于 340nm 测定吸光度变化，记录 10 s 和 310 s 吸光度为 A1 和 A2。

GST 活性计算公式：

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1). 按蛋白浓度计算

活性单位定义：在 25℃ 或者 37℃ 中，每毫克蛋白每分钟催化 1nmol/L CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

$$\text{GST (nmol/min/mg prot)} = (A2 - A1) \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \\ = 230 \times (A2 - A1) \div C_{\text{pr}}$$

(2). 按样本质量计算

活性单位定义：在 25℃ 或者 37℃ 中，每克样品每分钟催化 1nmol/L CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

$$\text{GST (nmol/min/g 鲜重)} = (A2-A1) \div \varepsilon \div d \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 230 \times (A2-A1) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：在 25℃ 或者 37℃ 中，每 10⁴ 个细胞每分钟催化 1nmol/L CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

$$\text{GST (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = (A2-A1) \div \varepsilon \div d \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 230 \times (A2-A1) \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：在 25℃ 或者 37℃ 中，每毫升液体每分钟催化 1nmol/L CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

$$\text{GST (nmol/min/mL)} = (A2-A1) \div \varepsilon \div d \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div V \text{ 样} \div T \\ = 230 \times (A2-A1)$$

ε : 产物摩尔消光系数, 9.6×10³ L/mol /cm; d : 比色皿光径, 1cm; 10⁶: 1mol=1×10⁶μmol;
 V 反总: 反应体系总体积, 220μL=2.2×10⁻⁴ L; C_{pr} : 上清液蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定, 建议选用本公司生产的 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒; W : 样品质量; V 样: 加入反应体系中上清液体积, 20μL=0.02 mL; V 样总: 提取液体积, 1 mL; T : 反应时间 (min), 5min。

b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下

(1). 按蛋白浓度计算

活性单位定义：在 25℃ 或者 37℃ 中，每毫克蛋白每分钟催化 1nmol/L CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

$$\text{GST (nmol/min/mg prot)} = (A2-A1) \div \varepsilon \div d \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div (C_{pr} \times V \text{ 样}) \div T \\ = 460 \times (A2-A1) \div C_{pr}$$

(2). 按样本质量计算

活性单位定义：在 25℃ 或者 37℃ 中，每克样品每分钟催化 1nmol/L CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

$$\text{GST (nmol/min/g 鲜重)} = (A2-A1) \div \varepsilon \div d \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 460 \times (A2-A1) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：在 25℃ 或者 37℃ 中，每 10⁴ 个细胞每分钟催化 1nmol/L CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

$$\text{GST (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = (A2-A1) \div \varepsilon \div d \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 460 \times (A2-A1) \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：在 25℃ 或者 37℃ 中，每毫升液体每分钟催化 1nmol/L CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。

$$\text{GST (nmol/min/mL)} = (A2-A1) \div \varepsilon \div d \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div V \text{ 样} \div T \\ = 460 \times (A2-A1)$$

ϵ : 产物摩尔消光系数, $9.6 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 96 孔板光径, 0.5cm ; 10^6 : $1\text{mol}=1 \times 10^6 \mu\text{mol}$;
 $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $220\mu\text{L}=2.2 \times 10^{-4} \text{ L}$; C_{pr} : 上清液蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定, 建议选用本公司生产的 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒; W : 样品质量; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积, $20\mu\text{L}=0.02 \text{ mL}$; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1 mL ; T : 反应时间 (min), 5min 。

注意事项:

1. 样品处理等过程均需要在冰上进行, 且须在当日测定酶活力;
2. 细胞中 GST 活性测定时, 细胞数目须在 300 万-500 万之间, 细胞中 GST 的提取时可加试剂一后研磨或超声波处理, 不能用细胞裂解液处理细胞;
3. 本法测定 GST 活性的线性范围可达 $76 \mu\text{mol/min/L}$, 测定前先用 1~2 个样做预实验, 如 5min 内反应不成线性, 须对样品用蒸馏水稀释, 计算结果乘以稀释倍数;
4. 测定反映的温度对测定结果有影响, 请控制在 25°C 或者 37°C (哺乳动物)。