

## 谷胱甘肽 S-转移酶（glutathione S-transferase, GST）试剂盒

分光光度法 50 管/48 样

**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：

紫外分光光度计、低温离心机、水浴锅、可调节移液器、1mL 石英比色皿和蒸馏水。

### 试剂组成和配置：

试剂一：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 45mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加 5 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(10<sup>4</sup>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。

#### 测定操作:

1.分光光度计预热 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 1mL 石英比色皿, 加入 100 μL 上清液, 900 μL 试剂二和 100 μL 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:

(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。
$$\text{GST (nmol/min/mg prot)} = (A2 - A1) \div \epsilon \div d \times 109 \times V_{\text{反总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 230 \times (A2 - A1) \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$\text{GST (nmol/min/g 鲜重)} = (A2 - A1) \div \epsilon \div d \times 109 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 230 \times (A2 - A1) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：在 25℃或者 37℃中，每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟催化 1nmol/L CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。 $GST (nmol/min/10^4 \text{ cell}) = (A2-A1) \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$   
 $= 230 \times (A2-A1) \div \text{细胞数量}$

#### (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。

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

$= 230 \times (A2-A1)$

$\epsilon$ ：产物摩尔消光系数， $9.6 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； $d$ ：比色皿光径，1cm； $10^6$ ： $1\text{mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$ ；

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积， $1100 \mu\text{L} = 0.0011 \text{ L}$

$L$ ； $C_{\text{pr}}$ ：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； $V$

样：加入反应体系中上清液体积， $100 \mu\text{L} = 0.1$

mL； $V$

样总：加入提取液体积，1mL； $W$ ，样本质量，g； $T$ ：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℃或者 37℃（哺乳动物）。

