（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

产品货号：E-BC-F043

产品规格：48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器：荧光酶标仪(激发波长 535 nm，发射波长 587 nm)

Elabscience®谷草转氨酶(AST/GOT)荧光法测试盒

Aspartate Aminotransferase (AST/GOT) Activity Fluorometric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100
邮箱：biochemical@elabscience.cn
网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清、血浆、动物组织、细胞与细胞上清样本中的谷草转氨酶的活力。

检测原理

谷草转氨酶(AST/GOT)是反映肝脏炎症的重要指标，当细胞受损时，细胞膜通透性增加，使胞浆内 AST 释放进入血液，导致血清 AST 活性增高。谷草转氨酶催化底物反应生成草酰乙酸，草酰乙酸脱羧生成丙酮酸。丙酮酸被氧化生成过氧化氢，过氧化氢使荧光探针发出荧光。体系内荧光强度的增加量与 AST 活性呈正比。

检测组织或细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	60 mL×1 瓶	60 mL×2 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	1.5 mL×1 支	1.5 mL×2 支	-20°C避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	酶试剂 (Enzyme Reagent)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	碱溶液 (Aqueous Alkali)	0.3 mL×1 支	0.6 mL×1 支	-20°C避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	100 mmol/L 丙酮酸标准品(100 mmol/L Pyruvate Standard)	1 mL×1 支	1 mL×1 支	-20°C避光 保存 6 个月
	96 孔黑色酶标板	96 孔×1 块		无要求
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，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。

所需自备物品

仪器：荧光酶标仪(激发波长 535 nm，发射波长 587 nm)

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 试剂三工作液的配制：

每支试剂三粉剂用1.2 mL试剂一充分溶解，避光并置于冰盒上待用，未用完的试剂-20°C避光可保存7天，避免反复冻融。

③ 反应工作液的配制：

将试剂一、试剂二、试剂三工作液、试剂四按照50：25：20：5体积比混合均匀。避光保存，现配现用，按需配制，1小时内使用完。

④ 1 mmol/L丙酮酸标准品储备液配制：

取10 μL试剂五加入990 μL试剂一，充分混匀，配制成1 mmol/L丙酮酸标准品储备液，现配现用。

⑤ 100 μmol/L丙酮酸标准品溶液配制：

取100 μL 1 mmol/L丙酮酸标准品储备液加入900 μL试剂一，充分混匀，配制成100 μmol/L丙酮酸标准品溶液，现配现用。

⑥ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(μmol/L)	**0**	**10**	**20**	**30**	**40**	**50**	**60**	**80**
100 μmol/L 标准品(μL)	0	20	40	60	80	100	120	160
试剂一(μL)	200	180	160	140	120	100	80	40

样本准备

① 样本处理

组织样本：匀浆介质为试剂一，匀浆后离心取上清置于冰上待测，留部分样本上清检测蛋白浓度。

血清血浆样本：可直接测定。若样本中含有较多脂质、乳糜等，可在4°C条件下5000 × g离心5 min，取澄清部分置于冰上待测。

细胞样本：取1×10^6个细胞加入1 mL试剂一，在4°C条件下进行匀浆或超声破碎，4°C下10000 × g离心10 min，取上清液置于冰上待测，留部分样本上清检测蛋白浓度。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.03-1.5 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%大鼠心组织	300-600	10%大鼠脑组织	300-500
10%大鼠肝组织	200-500	人血清	5-15
10%大鼠肾组织	200-500	大鼠血清	10-20
10%大鼠脾组织	50-100	293T 细胞(1×10^6)	10-20
10%小鼠肺组织	100-200	293T 细胞上清	5-15

注：稀释液为试剂一。

实验关键点

样本加入酶标板时触底加入

操作步骤

① 标准孔：向酶标板各标准孔中加入 20 μL 不同浓度标准品。
测定孔：向酶标板各测定孔中加入 20 μL 待测样本。

② 向①中加入 100 μL 反应工作液。

③ 振板 5 s，室温下避光静置 3 min。荧光酶标仪上设置激发波长 535 nm，发射光波长 587 nm，测定各孔荧光值，记为 F_1，室温下避光孵育 60 min，相同波长条件下测定各孔荧光值，记为 F_2，则 $\triangle F = F_2 - F_1$。

注：标准孔不需要求差值，直接取反应 60 min 后测定的荧光值做标准曲线即可。

操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度的标准品溶液(μL)	20	--
待测样本(μL)	--	20
反应工作液(μL)	100	100
振板 5 s，室温下避光静置 3 min。荧光酶标仪上设置激发波长 535 nm，发射光波长 587 nm，测定各孔荧光值，记为 F_1，室温下避光孵育 60 min，相同波长条件下测定各孔荧光值，记为 F_2，则 $\triangle F = F_2 - F_1$。		

注：标准孔不需要求差值，直接取反应 60 min 后测定的荧光值做标准曲线即可。

本试剂盒检测组织或细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

结果计算

标准品拟合曲线： $y = ax + b$

液体样本：

定义：25°C 条件下，每升血清样本每分钟催化底物反应生成 1 μmol 酮酸所需的酶量为一个酶活单位。

液体样本中 AST 活力计算公式：

$$\text{AST 活力 (U/L)} = \frac{\Delta F\text{-}b}{a} \div T \times f$$

组织、细胞样本：

定义：25°C 条件下，每克样本蛋白每分钟催化底物反应生成 1 μmol 丙酮酸所需的酶量为一个酶活单位。

组织、细胞样本中 AST 活力计算公式：

$$\text{AST 活力 (U/gprot)} = \frac{\Delta F\text{-}b}{a} \div T \times f \div C_{pr}$$

注解：

y：标准品荧光值-空白荧光值(标准品浓度为 0 时的荧光值)

x：标准品的浓度

a：标曲的斜率

b：标曲的截距

ΔF：样本的荧光值变化量（$\Delta F = F_2 - F_1$）

T：酶促反应时间，60 min

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

C_{pr}：样本的蛋白浓度，gprot/L

附录1 关键数据

1. 技术参数

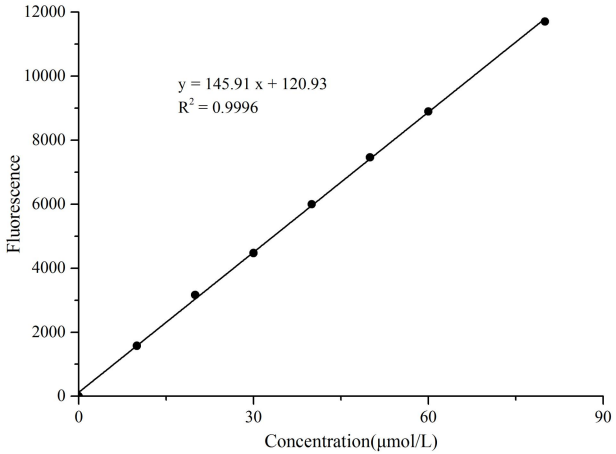
检测范围	0.03-1.5 U/L	**平均批间差**	7.3 %
灵敏度	0.03 U/L	**平均批内差**	2.2 %
平均回收率	100 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度标准品加样量20 μL，按照操作步骤进行实验， 荧光值如下表所示：

标准品浓度 (μmol/L)	**0**	**10**	**20**	**30**	**40**	**50**	**60**	**80**
荧光值	1026	2573	4244	5548	6970	8537	9731	12920
	1011	2622	4125	5431	7065	8426	10102	12529
平均荧光值	1019	2598	4185	5490	7018	8482	9917	12725
绝对荧光值	0	1579	3166	4471	5999	7463	8898	11706

②绘制标曲(如下图)：



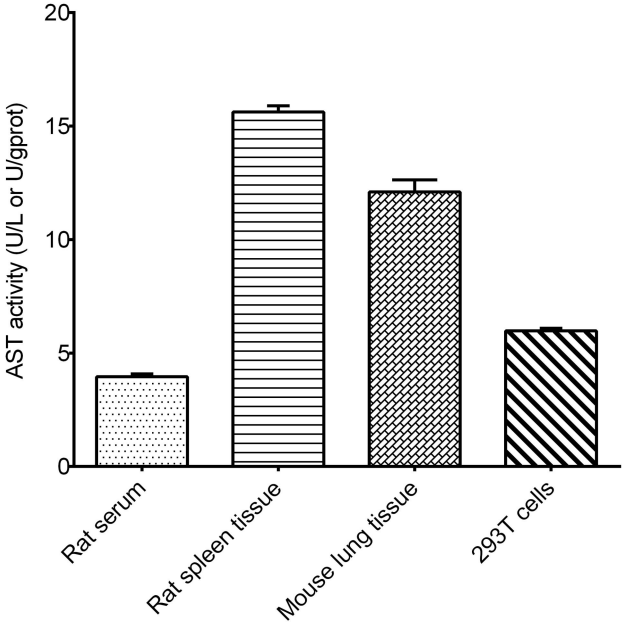
附录2 实例分析

例如检测大鼠脾组织(数据仅供参考)：

取20 μL 10%大鼠脾组织匀浆上清液，稀释80倍，按操作表进行检测，其结果如下： 标准曲线： $y = 96.281\,x + 202.56$，测定F_1平均值为1163，F_2平均值为9155，同时测得10%大鼠脾组织匀浆中蛋白浓度为6.90 gprot/L，AST计算结果为：

$$\text{AST 活力 (U/gprot)} = \frac{9155 - 1163 - 202.56}{96.281} \div 60 \times 80 \div 6.90 = 15.63\ \text{U/gprot}$$

按说明书操作，测定大鼠血清(稀释10倍，加样量20 μL)、大鼠脾组织(10%组织匀浆蛋白浓度6.90 gprot/L，稀释80倍，加样量20 μL)、小鼠肺组织(10%组织匀浆蛋白浓度6.58 gprot/L，稀释100倍，加样量20 μL)和293T细胞(匀浆蛋白浓度1.2 gprot/L，稀释10倍，加样量20 μL)中AST活性如下图：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
复孔差异大	加样本或反应工作液时间过长	尽量缩短加样时间，可使用排枪加入反应工作液
样本测不出值	样本稀释倍数太大	选择合适稀释倍数，重新检测
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本，重新检测

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。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。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

附录4 客户发表文献

1. Fang X, Ding H, Chen Y, et al. Wireless Optogenetic Targeting Nociceptors Helps Host Cells Win the Competitive Colonization in Implant-Associated Infections[J]. Small Methods, 2024, 8(12): 2400216.

2. Ma X, Zhang W, Chen Y, et al. Paeoniflorin inhibited GSDMD to alleviate ANIT-induced cholestasis via pyroptosis signaling pathway[J]. Phytomedicine, 2024, 134: 156021.

3. Cao C, Liu W, Guo X, et al. Identification and validation of efferocytosis-related biomarkers for the diagnosis of metabolic dysfunction-associated steatohepatitis based on bioinformatics analysis and machine learning[J]. Frontiers in Immunology, 2024, 15: 1460431.

4. Popa A, Usatiuc L O, Scurtu I C, et al. Assessing the Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity of Mangiferin in Murine Model for Myocarditis: Perspectives and Challenges[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(18): 9970.Y

5. Kaboutari M, Asle-Rousta M, Mahmazi S. Protective effect of menthol against thioacetamide-induced hepatic encephalopathy by suppressing oxidative stress and inflammation, augmenting expression of BDNF and α7-nACh receptor, and improving spatial memory[J]. European Journal of Pharmacology, 2024, 981: 176916.

6. Zhao Y, Wang R, Li A, et al. Protective effect of hydroxysafflor yellow a on thioacetamide-induced liver injury and osteopenia in zebrafish[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2024, 492: 117109.