（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-K800-M

产品规格：96T(40 samples)

检测仪器：酶标仪(400-420 nm)

Elabscience®谷胱甘肽 S-转移酶(GST)比色法测试盒(DTNB 法)

Glutathione-S-Transferase (GST) Activity Assay Kit (DTNB Method)

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(浆)、动物组织中 GST 的酶活力。

检测原理

谷胱甘肽 S-转移酶(GST)具有催化还原型谷胱甘肽(GSH)与二硝基苯(CDNB)结合的能力，通过测定底物 GSH 在单位时间内与二硝基苯结合的速率来表示酶的活力，反应剩余的 GSH 与二硫代双二硝基苯甲酸(DTNB)作用生成的黄色硫代硝基苯甲酸阴离子(TNB)，测定该阴离子浓度来计算出 GSH 的减少量。从而推算出谷胱甘肽 S-转移酶(GST)的酶活力。

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法(货号：E-BC-K318-M)。

提供试剂和物品

编号	名称	规格(Size)(96 T)	保存方式(Storage)
试剂一 (Reagent 1)	底物 (Substrate)	粉剂×1 瓶	2-8°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	储备液 (Stock Diluent)	12 mL×1 瓶	2-8°C 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	终止液 (Stop Solution)	50 mL×1 瓶	2-8°C 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	磷酸盐 (Phosphate)	15 mL×1 瓶	2-8°C 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	DTNB 溶液 (DTNB Solution)	5 mL×1 瓶	2-8°C 避光保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	标准品 (Standard)	粉剂×1 支	2-8°C 保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	标准品贮备液 (Standard Stock Solution)	3 mL×1 瓶	2-8°C 保存 6 个月
	96 孔酶标板	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：酶标仪(检测波长范围 400-420 nm，最佳检测波长 412 nm)，恒温箱。

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 基质液的配制：

取1瓶试剂一用10 mL试剂二溶解，2-8°C保存1天。

③ 试剂七应用液配制：

按体积比试剂七：双蒸水=1：9配制，2-8°C保存3天。

④ 1 mmol/L标准品溶液配制：

取一支试剂六用10 mL试剂七应用液溶解，即为1 mmol/L标准品溶液，2-8°C保存3天。

⑤ 250 μmol/L标准品溶液配制：

1 mmol/L标准品溶液与试剂七应用液按体积比1：3进行稀释，即为250 μmol/L标准品溶液，2-8°C保存3天。

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**	**25**	**75**	**100**	**125**	**150**	**200**	**250**
250 μmol/L GSH 标准品(μL)	0	30	90	120	150	180	240	300
试剂七应用液(μL)	300	270	210	180	150	120	60	0

样本准备

① 样本处理

血清血浆样本：可直接测定。

组织样本：组织样本匀浆液为 PBS(0.01 M，pH 7.4)或生理盐水(0.9% NaCl)。

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：2.1-92.8 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
人血清(血浆)	不稀释	10%大鼠肾组织	不稀释
马血清	不稀释	10%大鼠脑组织	不稀释
大鼠血清	不稀释	10%大鼠肝组织	不稀释
兔血清	不稀释	10%大鼠脾组织	不稀释
猪血清	不稀释	10%大鼠肺组织	不稀释

注：稀释液为 PBS(0.01 M，pH 7.4)或生理盐水(0.9% NaCl)。

实验关键点

① 必须严格控制反应时间及操作时间。

② 显色反应时，小心吸取孵育反应后的上清液，切勿将沉淀吸入。

操作步骤

酶促反应

① 非酶管：取 60 μL 基质液加入至 1.5 mL EP 管中。

酶管：取 60 μL 基质液，20 μL 样本加入至 1.5 mL EP 管混匀。

② 将步骤①中各管 37°C 孵育 30 min。

③ 取 400 μL 试剂三，20 μL 样本加入至步骤②非酶管中混匀。

取 400 μL 试剂三，加入至步骤②酶管中混匀。

④ 各管 3500 × g 离心 10 min，取上清液 100 μL 进行显色反应。(若上清液中有沉淀，吸取上清液至新 EP 管中，重新离心)。

显色反应

① 标准孔：取 100 μL 不同浓度的标准品溶液加入酶标板对应标准孔中。

非酶孔：取 100 μL 非酶管上清液加入酶标板对应非酶孔中。

酶孔：取 100 μL 酶管上清液加入酶标板对应酶孔中。

② 向步骤①各孔中加入 100 μL 试剂四，25 μL 试剂五。

③ 酶标仪振板 5 s，静置 5 min，酶标仪于波长 412 nm 处检测各孔吸光度。

操作表

酶促反应

	非酶管	酶管
基质液(μL)	60	60
待测样本(μL)		20
混匀，37℃ 孵育 30 min		
试剂三(μL)	400	400
待测样本(μL)	20	
混匀，各管 3500 × g 离心 10 min，取上清液 100 μL 进行显色反应。(若上清液中有沉淀，吸取上清液至新的 EP 管中，重新离心)		

显色反应

	标准孔	非酶孔	酶孔
标准品溶液(μL)	100		
非酶管上清液(μL)		100	
酶管上清液(μL)			100
试剂四(μL)	100	100	100
试剂五(μL)	25	25	25
酶标仪振板 5 s，静置 5 min，酶标仪于波长 412 nm 处检测各孔吸光度。			

本试剂盒检测组织样本时，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： $y = ax + b$

血清、血浆等液体样本：

定义： 在 37°C 条件下，每分钟每升液体使 GSH 浓度降低 1 μmol/L 所需要的酶量为一个酶活单位。

$$\text{GST 活力 (U/L)} = (\Delta A_{412} - b) \div a \div t \times 24 \times f$$

组织匀浆样本：

定义： 在 37°C 条件下，每分钟每克组织蛋白使 GSH 浓度降低 1 μmol/L 所需要的酶量为一个酶活单位。

$$\text{GST 活力 (U/gprot)} = (\Delta A_{412} - b) \div a \div t \times 24 \times f \div C_{pr}$$

注解：

y：标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x：标准品的浓度

a：标曲的斜率

b：标曲的截距

ΔA_{412}：非酶孔 OD 值-酶孔 OD 值

t：酶促反应时间(30 min)

24：酶促反应中样本的稀释倍数

C_{pr}：待测样本的蛋白浓度(gprot/L)

f：样本加入检测体系之前的稀释倍数

附录1 关键数据

1. 技术参数

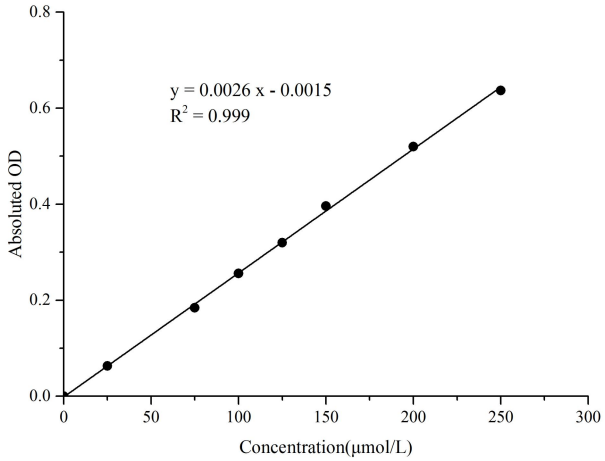
检测范围	2.1-92.8 U/L	平均批间差	6.4 %
灵敏度	2.1 U/L	平均批内差	1.8 %
平均回收率	105 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度的标准品加样量100 μL，按照操作步骤进行实验，于酶标仪412 nm处测得各浓度标准品OD值如下表所示：

标准品浓度 (μmol/L)	0	25	75	100	125	150	200	250
OD 值	0.054	0.118	0.238	0.310	0.375	0.450	0.574	0.691
	0.054	0.116	0.237	0.310	0.374	0.450	0.573	0.691
平均 OD 值	0.054	0.117	0.238	0.310	0.374	0.450	0.574	0.691
绝对 OD 值	0.000	0.063	0.184	0.256	0.320	0.396	0.520	0.637

②按上表数据绘制标准曲线，如下图所示：



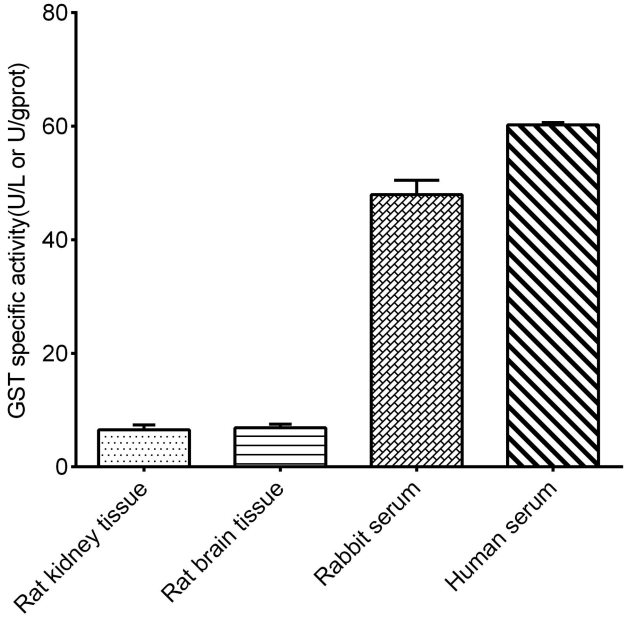
附录2 实例分析

例如检测人血清(数据仅供参考)：

取20 μL人血清，按操作表操作，结果如下：酶孔OD值：0.411，非酶孔OD值：0.612，标准曲线：y = 0.0026 x – 0.0017，计算结果为：

$$\text{GST活力 (U/L)} = (0.612 - 0.411 + 0.0017) \div 0.0026 \div 30 \times 24 = 62.4\ \text{U/L}$$

按照说明书操作，测定大鼠肾组织(10%组织匀浆蛋白含量5.36 gprot/L，加样量为20 μL)、大鼠脑组织(10%组织匀浆蛋白含量3.11 gprot/L，加样量为20 μL)、兔血清(加样量为20 μL)、人血清(加样量为20 μL)中的GST酶活力(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	显色反应样本上清液中有浑浊	重复离心，小心吸取上清液

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. Iannetta A , Zugaro S , Massimini M ,et al.Combined effects of glyphosate and chemical hypoxia in zebrafish: A new toxicological point of view[J].Chemosphere, 2024, 366.DOI:10.1016/j.chemosphere.2024.143484.

2. Maleki M , Tabnak P , Golchin A ,et al.Resveratrol inhibited colorectal cancer progression by reducing oxidative DNA damage by targeting the JNK signaling pathway[J].Heliyon, 2024, 10(21).DOI:10.1016/j.heliyon.2024.e38631.

3. Fazolin Petrucelli M , Martins-Santana L , Oliveira V M ,et al.The Transcription Factor StuA Regulates Oxidative Stress-Responsive Genes in Trichophyton rubrum[J].International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(23).DOI:10.3390/ijms252312959.