

谷草转氨酶/天冬氨酸氨基转氨酶 (GOT/AST) 检测试剂盒 (微量法)

货号: PMK1085

保存: 4°C 保存 6 个月

规格: 48T/96T

适用样本: 血清(浆)、动植物组织、细胞、细菌

产品简介

谷草转氨酶又叫天门冬氨酸氨基转移酶 (EC 2.6.1.1), GOT 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中, 催化可逆转氨基反应, 是氨基酸代谢的重要酶。此外, GOT 在心肌细胞中含量最高, 临床上一般常作为心肌梗塞和心肌炎的辅助检查。肝脏损害时其血清浓度也可升高。本试剂盒提供了一种简单的检测方法检测生物样本中 GOT 的活性水平。其原理是 GOT 催化 α -酮戊二酸和天门冬氨酸发生转氨基反应, 生成谷氨酸和草酰乙酸, 草酰乙酸进一步自行脱羧生成丙酮酸; 加入 2,4-二硝基苯肼溶液, 不仅终止上述反应, 而且与酮酸中的羰基加成, 生成丙酮酸苯腙; 苯腙在碱性条件下呈红棕色, 可以在 505nm 读取吸光值并计算 GOT 酶活力。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
提取液	50mL	100mL	4°C 保存
试剂一	1.5mL	3mL	4°C 保存
试剂二	1.5mL	3mL	4°C 避光保存
试剂三	15mL	30mL	4°C 保存
标准品 (10 μ mol/mL 丙酮酸)	1mL	1mL	4°C 保存

自备耗材

酶标仪或可见分光光度计 (能测 505nm 处的吸光度) 及水浴锅
96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头
恒温箱、低温离心机、制冰机
去离子水
匀浆器 (如果是组织样本)

试剂准备

注意: 各组分 (小管试剂) 开盖前, 请先低速离心。

提取液: 即用型; 使用前预冷; 4°C 保存。

试剂一: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4°C 保存。

试剂二: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4°C 避光保存。

试剂三: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4°C 保存。

标准曲线设置: 按下表所示用去离子水将 10 μ mol/mL 标准溶液稀释至 1.5、1、0.8、0.4、0.2、0.1、0.05 μ mol/mL 的标准液。

	10 μ mol/mL 标准品体积	去离子水体积 (μ L)	标准品浓度 (μ mol/mL)
Std. 1	60 μ L	340	1.5
Std. 2	40 μ L	360	1

产品说明书

Std. 3	32 μ L	368	0.8
Std. 4	16 μ L	384	0.4
Std. 5	8 μ L	392	0.2
Std. 6	4 μ L	396	0.1
Std. 7	2 μ L	398	0.05

注意：每次实验，请使用新配制的标准品；配制好的标准品需要在 4h 之内使用。

样本制备

组织：称取约 0.1g 样本，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆，8,000g，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。

细胞或细菌：收集 500 万细胞或细菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞，离心后弃上清，加入 1mL 提取液，冰浴超声波破碎细胞或细菌 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），8,000g，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。

血清（浆）样品：直接测定。

推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用 BCA 法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 酶标仪或可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 505nm，去离子水调零。

2. 取 25 μ L 代测样本至 EP 管中煮沸 10min 作为对照管。

3. 在 EP 管中加入下列试剂：

试剂名称	测定 (μ L)	对照 (μ L)	标准 (μ L)	空白 (μ L)
待测样本	25	0	0	0
煮沸 10min 的待测样本	0	25	0	0
试剂一	25	25	25	25
去离子水	0	0	0	25
标准品	0	0	25	0
混匀后，37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）准确反应 30min				
试剂二	25	25	25	25
混匀后，37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）准确反应 20min				
试剂三	240	240	240	240

反复吹打混匀，常温放置 10min，4000g 25℃离心 10min，吸取 200 μ L 反应液于 96 孔板或微量比色皿中，在 505nm 波长处测定各孔的吸光值 A。计算相对吸光值 $\Delta A_{\text{测}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 、 $\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。（空白孔和标准曲线只需做一次）

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果 $\Delta A_{\text{测}}$ 小于 0.001 可适当加大提取样本量。如果 $\Delta A_{\text{测}}$ 大于 1.0，样本可用去离子水进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数。

结果计算

1. 标准曲线的绘制：

以标准液浓度为 y 轴， $\Delta A_{\text{标}}$ 为 x 轴，绘制标准曲线（浓度为 y 轴更方便计算结果）。将 $\Delta A_{\text{测}}$ 带入方程计算出 y ($\mu\text{mol/mL}$)。

2. 样本 GOT 活性计算

（1）按样本鲜重计算：

单位定义：每 g 样本在反应体系中每小时催化产生 1 μmol 丙酮酸为一个活力单位。

产品说明书

$$\text{GOT (U/g 鲜重)} = y \times V_{\text{反应}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}}) \div T = 4y \div W$$

(2) 按细菌或细胞数量计算:

单位定义: 每 10^4 个细菌或细胞在反应体系中每小时催化产生 $1\mu\text{mol}$ 丙酮酸为一个活力单位。

$$\text{GOT (U/}10^4 \text{ Cells)} = y \times V_{\text{反应}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}}) \div T = 0.008y$$

(3) 按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每 mg 组织蛋白在反应体系中每小时催化产生 $1\mu\text{mol}$ 丙酮酸为一个活力单位。

$$\text{GOT (U/mg prot)} = y \times V_{\text{反应}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 4y \div \text{Cpr}$$

(4) 按液体样本体积计算

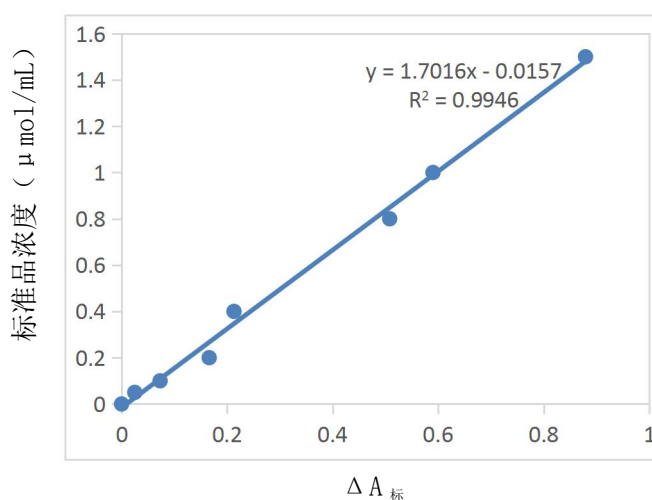
活性单位定义: 每 mL 液体样品在反应体系中每小时催化产生 $1\mu\text{mol}$ 丙酮酸为一个活力单位。

$$\text{GOT (U/mL)} = y \times V_{\text{反应}} \div V_{\text{样}} \div T = 4y$$

$V_{\text{反应}}$: 反应体系总体积, 0.05mL ; $V_{\text{样}}$: 样本体积, 0.025mL ; $V_{\text{提取}}$: 提取液体积, 1mL ; W : 样本鲜重, g ; Cpr : 样本蛋白质浓度, mg/mL ; T : 反应时间, 0.5h ; 500 : 细胞数量, 500 万个。

结果展示

典型标准曲线-以下数据和曲线仅供参考, 实验者需根据自己的实验建立标准曲线。



注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验, 尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究, 如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途, 我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用, 并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用; 否则, 可能导致结果异常。
5. 勤换吸头, 避免各组分之间的交叉污染。

相关产品:

PMK1084 谷丙转氨酶/丙氨酸氨基转氨酶 (GPT/ALT) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1091 谷氨酸 (Glu) 检测试剂盒 (微量法)

更多产品详情了解, 请关注公众号:

