

谷草转氨酶(GOT)活性测定试剂盒说明书

Glutamic- oxalacetic Transaminase Assay Kit

分光光度法

货号: AK086

规格: 50T/24S

产品清单及储存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES08	30mL×1 瓶	4℃保存
AK086-A	粉剂×1 瓶	4℃保存; 临用前加入少量提取液溶解, 并调 PH 值为 7.4, 然后定容至 5ml, 现用现配
AK086-B	8 mL×1 瓶	4℃保存
AK086-C	80 mL×1 瓶	4℃保存
AK086-标准品 (20 μ mol/ml)	1 mL×1 支	4℃保存

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

产品简介:

意义: 谷草转氨酶 (Glutamic-oxalacetic Transaminase, GOT) (2.6.1.1) 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。

原理: 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; 丙酮酸可与 2,4-二硝基苯肼反应生成 2,4-二硝基苯腙, 在碱性条件下显棕红色; 测定 505nm 吸光度的变化, 即可计算 GOT 酶活力。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1ml 玻璃比色皿、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

样品制备:

1. 细菌、细胞样品的制备:

细菌或培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 提取液 ES08 体积 (mL) 为 500~1000:1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液 ES08), 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2. 组织样品的制备:

组织: 按照组织质量 (g): 提取液 ES08 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液 ES08), 进行冰浴匀浆。8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

3. 血清 (浆) 样品: 直接检测

检测步骤:

1. 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 505nm, 蒸馏水调零。

2. 标准曲线的稀释: 将标准品用蒸馏水稀释至 $1 \mu\text{mol/mL}$ 、 $0.8 \mu\text{mol/mL}$ 、 $0.4 \mu\text{mol/mL}$ 、 $0.2 \mu\text{mol/mL}$ 、 $0.1 \mu\text{mol/mL}$ 、 $0.05 \mu\text{mol/mL}$ 、 $0 \mu\text{mol/mL}$ 。

3. 在 EP 管中按下表加入试剂:

试剂名称 (ul)	测定管	对照管	标准管
待测样本	20		
AK086-A	100	100	

标准液			120
混匀后, 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 反应 30min			
AK086-B	100	100	100
待测样本		20	
混匀后, 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 准确水浴 20min			
AK086-C	1000	1000	1000
混匀, 室温放置 10min, 在 505nm 波长处, 测各管吸光度。 每个测定管需设一个对照管。			

计算公式:

1. 标准曲线的绘制:

以各标准溶液浓度为 x 轴, 以 A505 为 y 轴做标准曲线, 得到方程 $y=kx+b$; 将 (A 测定管-A 对照管) 带入方程求 x 值。

2. GPT活性计算:

(1) 按样本质量计算:

单位定义: 每小时每 g 样本催化产生 1 μ mol 丙酮酸的量为一个 GOT 活力单位。

$$\text{GOT (U/g 质量)} = x \times (V_{\text{样本}} + \text{AK086-A}) \div (W \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 12x \div W$$

(2) 按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每小时每 mg 组织蛋白催化产生 1 μ mol 丙酮酸的量为一个 GOT 活力单位。

$$\text{GOT (U/mg prot)} = x \times (V_{\text{样本}} + \text{AK086-A}) \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样本}}) \div T = 12x \div C_{\text{pr}}$$

(3) 按血清 (浆) 体积计算:

单位定义: 每小时每 mL 血清 (浆) 样本催化产生 1 μ mol 丙酮酸的量为一个 GOT 活力单位。

$$\text{GOT (U/mL)} = x \times (V_{\text{样本}} + \text{AK086-A}) \div V_{\text{样本}} \div T = 12x$$

(4) 按细胞或细菌数量计算:

单位定义: 每小时每 10^4 个细胞或细菌催化产生 1 μ mol 丙酮酸的量为一个 GOT 活力单位。

$$\text{GOT (U/10}^4 \text{ cell)} = x \times (V_{\text{样本}} + \text{AK086-A}) \div (500 \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.024x$$

V 样本: 0.02mL; AK086-A: 0.1mL; V 样总: 提取液体积, 1mL; W: 样本质量, g; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; T: 反应时间, 0.5h; 500: 细胞或细菌总数, 500 万。