

谷草转氨酶 (AST/GOT) 测试盒说明书

(货号:C010-1-1 比色法 100管/50样)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验,否则由此导致的后果用户自行承担!

一、测定原理:

AST/GOT 能使 α -酮戊二酸和天门冬氨酸移换氨基和酮基,生成谷氨酸和草酰乙酸。草酰乙酸在反应过程中可自行脱羧成丙酮酸。丙酮酸与 2,4-二硝基苯肼反应生成 2,4-二硝基苯腙,在碱性溶液中显红棕色。比色后,查标准曲线,可求得酶的活力单位。

二、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 6 个月)

试剂一: 基质液, 50mL x 1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二: 显色剂, 50mL x 1 瓶, 4℃ 保存;

试剂三: 浓缩终止液, 50mL x 1 瓶, 室温密封保存; 临用时按 1:9 的比例加蒸馏水 (即 10 倍稀释) 配成终止液, 需多少配多少, 室温密封保存。

试剂四: 丙酮酸钠标准液 x 1 支, 4℃ 保存;

试剂五: 磷酸盐缓冲液 x 1 支, 4℃ 保存。

三、操作步骤:

1、样本前处理:

①、血清 (浆) 及其它液体样本待测: 直接取样测定。

②、动物组织样本: 准确称取组织重量, 按重量 (g): 体积 (mL)=1:9 的比例, 加入 9 倍体积的生理盐水, 冰水浴条件下机械匀浆, 制成 10% 的组织匀浆, 2500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液, 再用生理盐水稀释到适宜浓度待测。(取部分上清液测蛋白浓度, 蛋白定量试剂盒本公司有售)

③、细胞样本前处理: 将收集好的细胞用等渗缓冲液 (推荐 0.01mol/L, pH7~7.4 磷酸盐缓冲液或生理盐水) 清洗 1~2 次; 1000 转/分, 离心 10 分钟, 弃上清, 留细胞沉淀, 加入匀浆介质 (推荐加入 0.01mol/L, pH7~7.4 磷酸盐缓冲液或生理盐水), 冰水浴条件下超声破碎或手动匀浆, 制备好的匀浆液不离心, 待测。(取部分匀浆液测蛋白浓度, 蛋白定量试剂盒本公司有售)

注: 预实验以测定 OD - 对照 OD 值在标曲范围内 (中间位置最佳) 或在 0.2 左右对应的浓度为宜。血清 (浆)、培养液等一般原液测定, 肝组织匀浆一般需要再稀释 10-50 倍后测定, 细胞匀浆一般也是原液测定。

2、操作表: (试剂一提前 5 分钟 37℃ 预温)

	测定管	对照管
待测样本 (mL)	0.1	0.1
试剂一 (mL)	0.5	0.5
混匀, 对照管立即加试剂二, 测定管 37℃ 水浴 30 分钟后再加试剂二		
试剂二 (mL)	0.5	0.5
混匀, 37℃ 水浴 20 分钟		
终止液 (mL)	5	5
混匀, 室温放置 5 分钟, 505nm 波长, 光径 1cm, 蒸馏水调零, 测各管 OD 值, 以 (绝对 OD 值=测定管 OD 值减去对照管 OD 值), 代入标准曲线, 求得相应的 AST/GOT 活力。		

3、计算公式:

血清 (浆) GOT = 代入标曲计算得值 $\times 0.48$
活力 U/L (卡门氏单位)

组织、细胞中 GOT 活力 = 代入标曲计算得值 $\times 0.482 \div Cpr$
(U/gprot) (卡门氏单位)

Cpr: 组织匀浆蛋白浓度, gprot/L (prot 指蛋白)

四、注意事项:

1、严重脂血、黄疸或溶血血清可能会引起测定管吸光度增加, 因此, 检测此类标本时, 需注意操作手法, 避免因样本引起

的误差过大。

2、当血清标本酶活力超过 150 卡门氏单位时, 应将血清用生理盐水稀释 5 倍或 10 倍后进行测定。

3、反应时加入试剂二后, 应充分混匀, 使反应完全, 加终止液方法要一致, 不同方法会导致吸光度读数的差异。

4、比色法中常用的有赖氏 (Reitman-Frankel) 法及金氏 (King) 法。赖氏法标准曲线所定单位数, 是用实验方法和卡门氏分光光度法 (速率法) 作对比测定求得的。以卡门氏单位报告结果, 比较准确。

卡门氏单位定义: 1mL 血清, 反应液总容量 3mL, 340nm 波长, 1cm 光径, 25℃, 1min 内所生成的丙酮酸, 使 NADH 氧化成 NAD⁺而引起吸光度每下降 0.001 为一个卡门氏单位。

5、血清中 AST/GOT 在室温 (25℃) 可保存 2 天, 在 0~4℃ 可保存一周, 在 -25℃ 可保存 1 个月。

6、1 卡门氏单位=0.482 U/L, 25℃。

7、操作表 (包括标曲操作表) 中各个组分加入量可依需要按比例增减。

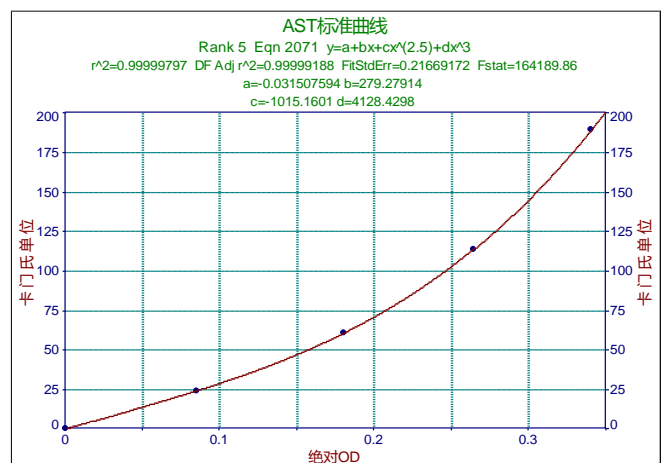
附录: AST 标准曲线

1、操作表:

	0	1	2	3	4
试剂五 (mL)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
丙酮酸钠标准液 (mL)	0	0.05	0.10	0.15	0.20
试剂一 (mL)	0.50	0.45	0.40	0.35	0.30
试剂二 (mL)	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
混匀后, 37℃ 水浴 20 分钟					
终止液 (mL)	5	5	5	5	5
混匀, 室温放置 5 分钟, 505nm, 光径 1cm, 蒸馏水调零, 测各管吸光度值 A。					

2、测定结果 (附参考标准曲线):

管号	0	1	2	3	4
吸光度	0.314	0.399	0.500	0.578	0.660
绝对吸光度	0	0.085	0.186	0.264	0.346
相当于卡门氏单位	0	24	61	114	190



【注】: 标准曲线需要客户自己制作才更准确, 操作步骤参照上表; 上表所列的卡门氏单位数值与各标准孔的标准品加样量是对应的, 所以该值固定不变, 客户可以由此值和自己按操作表求得的各标准孔的吸光值作多项式曲线 ($R^2 \geq 0.99$), 得到计算公式用于样本计算。