

# 组织细胞天门冬氨酸氨基转移酶（谷草转氨酶）AST/GOT 活性检测

## 试剂盒（赖氏法） E2024

**描述：**天门冬氨酸氨基转移酶又称谷草转氨酶、天门冬氨酸氨基转换酶，英文名称 Aspartate transaminase（简称 AST）；aspartate aminotransferase（简称：AspAT/ASAT/AAT）；serum glutamic oxaloacetic transaminase(简称 SGOT 或 GOT)。在机体中以心肌含量最为丰富，其他组织如：肝脏、肌肉、肾、肺也含有此酶。急性心肌梗塞、急性肺炎、极大手术后此酶的活性明显升高。另外，在肝、肾、肺、心、胸膜等脏器发生炎性病变时都可见此酶活性中度或轻度的升高。试剂盒可以测定血清、血浆等样本中谷草转氨酶活性。

**原理：**试剂盒采用赖氏法进行 AST 活性检测。谷草转氨酶（AST/GOT）能催化天门冬氨酸和  $\alpha$ -酮戊二酸生成草酰乙酸，草酰乙酸脱羧形成丙酮酸，其可与显色剂（2，4-二硝基苯胂）作用生成丙酮酸二硝基苯胂，在碱性条件下呈棕红色，颜色深浅可以反映酶活性高低。

**适应范围：**本试剂盒可以检测组织或培养细胞中的谷草转氨酶的活性。

**组成：**（105 次）

组分	规格	保存条件
组织细胞裂解液	100ml	4℃ 保存
丙酮酸标准品	0.6ml	-20℃ 避光保存
底物缓冲液	6ml	4℃ 避光保存
PB 缓冲液	0.6ml	4℃ 保存
显色剂：2，4-二硝基苯胂溶液	6ml	4℃ 避光保存
终止试剂	60ml	常温保存

**储存：**以上组分按要求保存，6 个月有效。

### 操作步骤：

#### 一. 样品准备：

1、动物用生理盐水(0.9% NaCl，含有 0.16mg/ml 肝素钠) 灌流清除血液后获取组织样品。按照 100mg 组织加入 500ul-1000ul，4℃ 或冰浴预冷组织细胞裂解液,使用玻璃匀浆器或电动匀浆器等 4℃ 或冰浴匀浆。随后 4℃ 12000rpm 离心 5min，取上清，部分进行蛋白定量（普利莱 BCA 法蛋白定量试剂盒 P1511）。

2、收集细胞，按照每  $10^7$  个细胞加入 500ul-1000ul，4℃ 或冰浴预冷组织细胞裂解液,使用玻璃匀浆器或电动匀浆器等 4℃ 或冰浴匀浆。随后 4℃ 12000rpm 离心 5min，取上清，部分进行蛋白定量（普利莱 BCA 法蛋白定量试剂盒 P1511）。

#### 二.酶活力测定：

1. 丙酮酸标准品工作液的配制：按下表用底物缓冲液和 PB 缓冲液将丙酮酸标准品稀释成 0、1.1ug、2.2ug、3.3ug、4.4ug、5.5ug 七个浓度，充分混匀。丙酮酸 0 浓度孔只加底物缓冲液和 PB 缓冲液，以此作为空白孔调零，按照下述操作步骤操作，而后在 520nm 处读吸光度 OD 值，绘制标准曲线。

使用分光光度计测定，丙酮酸标准品工作液稀释比例：

PB 缓冲液 (ul)	10	10	10	10	10	10
底物缓冲液 (ul)	50	45	40	35	30	25
丙酮酸标准品 (ul)	0	5	10	15	20	25
对应丙酮酸微克数	0	1.1	2.2	3.3	4.4	5.5

使用酶标仪测定，丙酮酸标准品工作液稀释比例：

PB 缓冲液 (ul)	4	4	4	4	4	4
底物缓冲液 (ul)	20	18	16	14	12	10
丙酮酸标准品 (ul)	0	2	4	6	8	10
对应丙酮酸微克数	0	0.44	0.88	1.32	1.76	2.2

## 2. AST 活性测定：

参照下表使用分光光度计进行操作。

	丙酮酸标准品工作液	样本管	样本对照管	空白管
样本 (ul)	--	10	10	--
标准品工作液 (ul)	60	--	--	--
蒸馏水 (ul)	--	--	--	10
底物缓冲液 (ul)	--	50	---	--
充分混匀，37℃，孵育 30 分钟				
显色剂；2,4-二硝基苯肼溶液 (ul)	50	50	50	50
底物缓冲液 (ul)	--	--	50	50
充分混匀，37℃，孵育 20 分钟				
终止试剂 (ul)	500	500	500	500
充分混匀，室温静置 10 分钟，于波长 520nm 使用分光光度计测定各标准品和样本管吸光度值,注意设置样品空白管。				

使用酶标仪测定反应体系：

	丙酮酸标准品工作液	样本管	样本对照管	空白管
样本 (ul)	--	4	4	--
标准品工作液 (ul)	24	--	--	--
蒸馏水 (ul)	--	--	--	4

底物缓冲液 (ul)	--	20	---	--
充分混匀, 37℃, 孵育 30 分钟				
显色剂; 2,4-二硝基苯肼溶液 (ul)	20	20	20	20
底物缓冲液 (ul)	--	--	20	20
充分混匀, 37℃, 孵育 20 分钟				
终止试剂 (ul)	200	200	200	200
充分混匀, 室温静置 10 分钟, 于波长 520nm 酶标仪测定各标准品和样本管吸光度值, 注意设置样品空白管。				

### 三、AST 酶活力计算:

以丙酮酸微克数为 x 轴, 测得的吸光度 OD 值为 y 轴, 绘制标准曲线, 根据标准曲线计算样本对应的丙酮酸质量, 然后根据 AST 酶活力单位计算公式, 计算 AST 酶活性, 建议以蛋白浓度进行校正。

#### 酶标仪测定, AST 酶活力:

**未稀释样本 AST 酶活力** = (样本管丙酮酸微克数-样本对照管丙酮酸微克数) × 250/2.5

**稀释样本 AST 酶活力** = (样本管丙酮酸微克数-样本对照管丙酮酸微克数) × 稀释倍数 × 250/2.5

#### 分光光度计测定时, AST 酶活力:

**未稀释样本 AST 酶活力** = (样本管丙酮酸微克数-样本对照管丙酮酸微克数) × 100/2.5

**稀释样本 AST 酶活力** = (样本管丙酮酸微克数-样本对照管丙酮酸微克数) × 稀释倍数 × 100/2.5

**AST 酶活力单位定义:** 每毫升样本在 37℃ 与底物作用 30min 后, 能产生 2.5ug 的丙酮酸为一个丙氨酸氨基转移酶活力单位。

#### 说明:

- 1、谷草转氨酶的正常参考值为 0~50U。
- 2、标准曲线上数值在 20~100U 是准确可靠的, 超过 200 U 时, 需将样品稀释。
- 3、溶血标本不宜使用, 因血细胞内转氨酶活力较高, 会影响测定结果。