

谷草转氨酶（AST/GOT）测试盒说明书(精简版)

(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、试剂的组成与配制：(试剂盒有效期 6 个月)

- 试剂一：**谷草转氨酶基质液,50mL×1 瓶，4℃保存；
试剂二：2,4—二硝基苯肼液,50mL×1 瓶，4℃保存；
试剂三：4mol/L 氢氧化钠液,50mL×1 瓶，室温密封保存；
0.4mol/L 氢氧化钠液的配制:临用时按 4mol/L 氢氧化钠液:双蒸水=1：9 的比例稀释，需多少配多少，室温密封保存。
试剂四：2μmol/mL 丙酮酸钠标准液×1 支，4℃保存；
试剂五：0.1mol/L 磷酸盐缓冲液×1 支，4℃保存。

三、所需仪器及试剂：

可调 505nm 波长的可见分光光度计及 1cm 光径比色皿，蒸馏水，涡旋混匀器，37℃水浴锅或恒温箱，蛋白测定试剂（动物组织用，本公司有售）。

四、操作表：

1、血清及细胞培养液的测定：直接取样进行测定

	测定管	对照管
待测样本（mL）	0.1	
试剂一(37℃预温 5 分钟以上)（mL）	0.5	0.5
混匀后，37℃水浴 30 分钟		
试剂二（mL）	0.5	0.5
待测样本（mL）		0.1
混匀后，37℃水浴 20 分钟		
0.4mol/L 氢氧化钠液（mL）	5	5
混匀，室温放置 5 分钟，505nm 波长，光径 1cm，双蒸水调零，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。		

2、肝脏组织的测定：

- ①、**样本前处理：**准确称取组织重量,按重量(g):体积=1:9 的比例,加入 9 倍体积的生理盐水,冰水条件下机械匀浆,制备成 10%的组织匀浆,2500 转/分,离心 10 分钟,取上清液,再用生理盐水 10 倍稀释成 1%的浓度待测。(同时取部分上清液测蛋白浓度,蛋白定量试剂盒本所有售)
②、**操作表：**

	测定管	对照管
待测样本（mL）	0.1	
试剂一(37℃预温 5 分钟以上)(mL)	0.5	0.5
混匀后，37℃水浴 30 分钟		
试剂二（mL）	0.5	0.5
待测样本（mL）		0.1
混匀后，37℃水浴 20 分钟		
0.4mol/L 氢氧化钠液（mL）	5	5
混匀，室温放置 5 分钟，505nm 波长，光径 1cm，双蒸水调零，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：**

组织中GOT活力 = 通过标准曲线得 待测匀浆液蛋白
(U /gprot) = 匀浆液GOT活力 (U/L)浓度(gprot /L)
(标准曲线做法参照附录 I)

五、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，应该做血清标本对照管。
2、一般血清标本内源性酮酸很少，血清对照管吸光度值接近试剂空白管（以 0.1mL 蒸馏水代替血清，其他和对照管同样操作）。所以，成批标本测定时，一般不需要每一标本都作本身血清对照管，以试剂空白管代替即可，但对超过正常的血清标本应进行复查，复查时，每份标本应作对照管。
3、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。
4、加入 2，4-二硝基苯肼溶液后，应充分混匀，使反应完全，加氢氧化钠溶液方法要一致，不同方法会导致吸光度读数的差异。
5、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。
6、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。
7、1 卡门氏单位=0.482 U/L,25℃

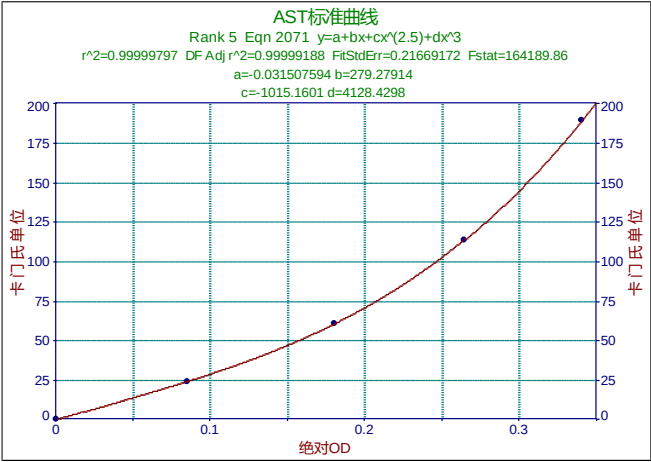
附录 I：AST 标准曲线

1、操作表：

	0	1	2	3	4
0.1mol/L 磷酸缓冲液（mL）	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
2μmol/mL 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					
0.4mol/L 氢氧化钠液（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，以各管吸光度值减去零管吸光度值，所得差值为横坐标，相应的卡门氏单位为纵坐标，作坐标图。					

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已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。