



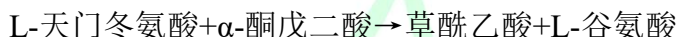
上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

天门冬氨酸氨基转移酶(AST)检测试剂盒(赖氏微板法)

简介:

转氨酶是催化 α -氨基酸和 α -酮酸之间氨基转换反应的一组酶, 天门冬氨酸氨基转移酶(AST)旧称谷草转氨酶(GOT)主要存在于心肌、骨骼肌、肝脏, 以心肌含量最高, 肝脏次之, AST 能够催化天门冬氨酸和 α -酮戊二酸的氨基转移作用, 形成谷氨酸和草酰乙酸。

源叶生物 天门冬氨酸氨基转移酶(AST)检测试剂盒(赖氏微板法)其检测原理是 AST 催化天门冬氨酸与 α -酮戊二酸之间的氨基转移反应, 其反应公式如下:



二硝基苯肼与 α -酮酸反应生成相应的二硝基苯腙, 在碱性条件下二硝基苯腙的吸收光谱有差异, 通过酶标仪检测在 500-520nm 处差异最大, 以等摩尔浓度计算出丙酮酸的生成量, 进而计算酶的活性。100T 该检测试剂盒可检测 50 个样品(不含标准品), 该试剂盒仅用于科研领域, 不宜用于临床诊断或其他用途。

组成:

名称 \ 编号	R21817 100T	Storage
试剂(A): 丙酮酸标准	22mg	RT
试剂(B): 丙酮酸标准稀释液	5ml	RT
试剂(C): 标准对照液	2ml	4℃
试剂(D): AST Assay buffer	3ml	4℃ 避光
试剂(E): 二硝基苯肼显色液	3ml	4℃ 避光
试剂(F): AST 显色基液(5×)	5ml	RT
使用说明书	1 份	

自备材料:

- 1、蒸馏水或去离子水
- 2、离心管、水浴锅或恒温箱
- 3、96 孔板、酶标仪

操作步骤(仅供参考):

1、准备样品:

①血浆、血清样品: 血浆、血清按照常规方法制备, 可以直接用于本试剂盒的测定, -20°C 保存 1 个月有效, 用于 AST/GOT 的检测。

②细胞或组织样品: 取恰当细胞或组织进行匀浆, 低速离心取上清, -20°C 保存 1 个月有效, 用于 AST/GOT 的检测。

③(选做)样品准备完毕后可以用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度, 以便于后续计算单位蛋白重量组织或细胞内的 AST/GOT 含量。

2、配制 AST 显色基液(1 \times): 取 AST 显色基液(5 \times)一份加入蒸馏水 4 份稀释即可使用。

3、制作 AST 标准曲线: 取丙酮酸标准 1 支, 准确加入丙酮酸标准稀释液 1ml, 充分混匀, 即配制成丙酮酸标准(100mmol/L), 4°C 保存备用。临用前, 取适量的丙酮酸标准(100mmol/L), 按丙酮酸标准(100mmol/L): 丙酮酸标准稀释液=1: 49 的比例混合, 即为丙酮酸标准工作液-丙酮酸标准(2mmol/L), 按下表制备标准曲线。最好设定平行检测孔, 求平均值。

加入物(μl)	0	1	2	3	4
丙酮酸标准(2mmol/L)	0	2	4	6	8
标准对照液	4	4	4	4	4
AST Assay buffer	20	18	16	14	12
相当于 AST/GOT(卡门单位)	0	24	61	114	190

混匀, 向各管中加入二硝基苯肼显色液 $20\mu\text{l}$, 37°C 孵育 20min 后加入 AST 显色基液(1 \times) $200\mu\text{l}$, 混匀。室温放置 5min, 以蒸馏水调零, 酶标仪测定 505nm 处各孔的吸光度。各孔的吸光度均减去“0”号孔的吸光度, 所得吸光度的差值(纵坐标)与对应的卡门酶活力单位(横坐标)作图。



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

4、AST 酶促反应: 按照下表设置对照孔、测定孔, 溶液应按照顺序依次加入, 并注意避免产生气泡。如果样品中的酶活性过高, 可以减少样品用量或适当稀释后再进行测定。

加入物(μ l)	对照孔	测定孔
待测样品(如血清等)	4	4
AST Assay buffer	—	20
混匀, 37℃ 孵育 60min。		
AST Assay buffer	20	—
二硝基苯肼显色液	20	20
混匀, 37℃ 孵育 20min。		
AST 显色基液(1×)	200	200

5、AST 测定: 混匀, 室温放置 5min, 以蒸馏水调零, 酶标仪 505nm 处测定对照孔、测定孔的吸光度(即为 $A_{\text{对照}}$ 、 $A_{\text{测定}}$)。

计算:

以标准活力单位(24、61、114、190)为横坐标, 以对应的吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线, 测定孔的吸光度减去对照孔的吸光度的差值(即 $A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$), 从标准曲线查得 AST 活力单位。

参考范围: 成年健康人血清 AST: 8~28 卡门单位/ml

注意事项:

- 1、二硝基苯肼显色液溶解以后, 如果仍然有结晶析出, 应弃用。
- 2、AST 显色基液(5×)有一定腐蚀性, 请小心操作。
- 3、AST Assay buffer 使用前应 37℃ 提前孵育 5min。
- 4、由于赖氏法的特点, 在绘制标准曲线时每个点最好做 3 孔的重复测定, 求出各标准管的吸光度均值, 减去“0”号管吸光度均值后, 对照赖氏单位绘制

标准曲线。

5、血清中 AST 活性在室温可以保存 2 天，4℃ 保存 1 周，-20℃ 保存 1 个月。

6、成批样本测定时，一般无需每份样本都做自身血清对照，以试剂空白代替即可。

7、对于超过正常范围的血清样本，应该进行复测，复测时每份样本都应做自身血清对照。

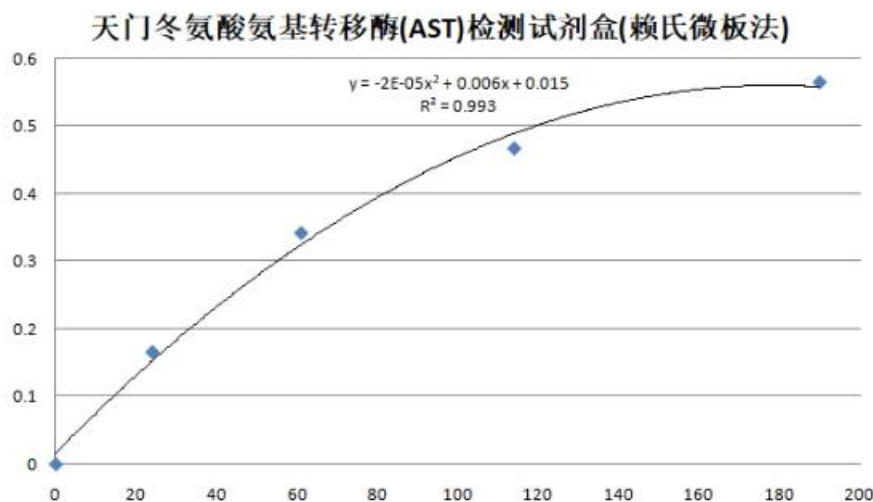
8、严重黄疸、脂血或溶血的血清，可能会引起测定孔的吸光度增高，因此检测该类样本时应做自身血清标本对照。

9、当样本的酶活力大于 190 卡门单位时，应将样本进行 5~10 倍稀释后再行测定。

10、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期：6 个月有效。4℃ 运输，4℃ 保存。

附录：参考标准曲线：通过酶标仪 505nm 测定不同丙酮酸标准浓度所对应的卡门单位其吸光度多在 0.15~0.6 之间，加入 AST 显色基液(1×)后其颜色依次为黄色至棕红色，应及时检测，随着时间的延长其颜色会加深。测定卡门单位为 0、24、61、114、190 对应的吸光度，据此作出标准曲线如下：





上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

注意: 由于检测仪器和操作手法等条件的不同, 参考值范围会有波动, 该值仅供参考, 对于要求精确计算 AST 含量的, 可以采用标准曲线进行多点重复测定; 根据测定经验显示样品酶活力大于 190 卡门单位以上, 标准曲线会有偏差。

