

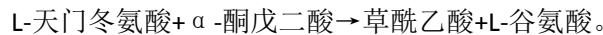
天门冬氨酸氨基转移酶(AST)检测试剂盒(赖氏微板法)说明书

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

产品简介：

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。

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。

产品组成：

| 名称 | 规格 | 保存条件 |
|------------------------|------|------|
| 天门冬氨酸氨基转移酶(AST)检测试剂盒 | 100T | 4℃ |
| 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 | 25ml | RT |
| 使用说明书 | 1份 | |
| 有效期 | 6个月 | |

自备材料：

- 1、蒸馏水
- 2、离心管
- 3、水浴锅或恒温箱
- 4、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、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(37°C 提前孵育 5min) | 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 $200\mu\text{l}$, 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。

3、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(μl) | 对照孔 | 测定孔 |
| 待测样品(如血清等) | 4 | 4 |
| AST Assay buffer(37°C 提前孵育 5min) | - | 20 |
| 混匀, 37°C 孵育 60min。 | | |
| AST Assay buffer(37°C 提前孵育 5min) | 20 | - |
| 二硝基苯肼显色液 | 20 | 20 |
| 混匀, 37°C 孵育 20min。 | | |
| AST 显色基液 | 200 | 200 |

4、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 对照、A 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 测定-A 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、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。
- 3、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。
- 4、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，但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。
- 5、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。
- 6、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。
- 7、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。