

Glutathion S-Transferase (GST) Assay Kit

Zur Bestimmung der GST-Aktivität in biologischen Proben

Glutathione S-Transferase (GST) Assay Kit

For the determination of GST activity in biological samples

Gültig ab / Valid from 19.11.2007



K 2631



100



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim
Tel.: ++49 6251 70190-0
Fax: ++ 49 6251 849430
e.mail: Info@immundiagnostik.com
www.immundiagnostik.com

Inhalt / Content

1. Deutsch
2. English

Weitere Informationen zu unseren Produkten finden Sie auf unserer
Homepage

Additional information about our products is available on our homepage

www.immundiagnostik.com

1. VERWENDUNGSZWECK

Der Glutathion S-Transferase (GST) Assay Kit ist für die Bestimmung der Gesamt-GST Aktivität in Zell- und bakteriellen Lysaten, Gewebekomogenisaten und in Erythrocyten-Lysaten geeignet. Nur für Forschungszwecke.

2. EINLEITUNG

Die Enzymfamilie der Glutathion-S-Transferasen (GST) spielt eine entscheidende Rolle in der Entgiftung von Xenobiotika. GST katalysiert die Übertragung der Thiolgruppe des Glutathion auf elektrophile Moleküle. Dabei wird die Ausscheidungsfähigkeit verschiedener Substanzen durch Überführung in hydrophilere Metaboliten erhöht. Die Enzyme fungieren somit als ein Teil des Abwehrmechanismus gegen mutagene, kanzerogene und toxische Effekte solcher Verbindungen.

Der GST-Aktivitäts-Test basiert auf der GST-katalysierten Reaktion zwischen GSH und dem GST Substrat, CDNB (1-Chloro-2,4-dinitrobenzol), zum entsprechenden Thioether-Konjugat. Die Konjugatbildung ist proportional zur Enzymaktivität und kann zur photometrischen Aktivitätsbestimmung der GST herangezogen werden, indem die Bildung des Konjugates beim Absorptionsmaximum von 340 nm kinetisch verfolgt wird.

Indikation

- Detoxifikationsmarker

3. TESTPRINZIP

Die GST katalysiert die Bindung von L-Glutathion an CDNB über die Glutathion-Thiolgruppe.



Die GS-DNB-Konjugatbildung ist proportional zur Enzymaktivität und kann zur photometrischen Aktivitätsbestimmung der GST herangezogen werden, indem die Bildung des Konjugates beim Absorptionsmaximum von 340 nm kinetisch verfolgt wird.

Eine Einheit der GST Aktivität ist definiert als die Menge, die das Enzym bei der Konjugation von 1 mmol GS-DNB pro Minute unter Testbedingungen produziert.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 2631BU	ASYBUF	GST Assaypuffer	2 x 65 ml
K 2631KO	CTRL POS	GST Positivkontrolle	10 x 1 vial
K 2631SUB	SOL A	Substrat (CDNB)	10 x 120 µl
K 2631GSH	SOL B	L-Glutathion reduziert	10 x 120 µl
K 2631PV	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer	1 x 80 ml

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Temperaturkontrolliertes UV/VIS-Spektrometer
- 1 ml einmal- oder Quarz-Küvetten
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 5 - 1000 µl
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Laborübliche Glas- oder Einmalartikel, Plastikröhrchen (1,5 ml)
- Zentrifuge, 14000 x g
- Vortex-Mixer

6. PROBENVORBEREITUNG

Erythrozyten

200 µl SAMPLEBUF (Probenverdünnungspuffer) zu **50 µl** der zuvor eingefrorenen **EDTA Vollblut-Probe** oder zu der **CTRL POS** (Positivkontrolle) pipettieren, 10 sec vortexen.

Anschließend 10 min bei 14000 x g, wenn möglich unter Kühlung zentrifugieren.

Den Überstand abnehmen und für den Test einsetzen.

Durch das Tieffrieren der Vollblutprobe und die anschließende Behandlung mit dem SAMPLEBUF (Probenpuffer) wird die vollständige Lyse der Erythrocytenzellen gewährleistet.

7. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- **SOL A** (Substrat), **CTRL** (Kontrolle) und **SOL B** (Glutathion) sind stabil bei **-20 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum.
- **ASYBUF** (GST Assaypuffer) und **SAMPLEBUF** (Probenverdünnungspuffer) bei Raumtemperatur auftauen lassen.
- **SOL A** (Substrat) und **SOL B** (Glutathion) unmittelbar vor dem Einsatz bei Raumtemperatur auftauen lassen.
- **Herstellung der Reaktionslösung ausreichend für 10 Messungen:**

ASYBUF	9,8 ml
SOL A	0,1 ml
SOL B	0,1 ml

Durch Zugabe des SOL A kann eine leichte Trübung auftreten, welche nach sorgfältiger Durchmischung der Lösung verschwindet.

Wichtig: die Substratlösung muss für jede Messreihe frisch angesetzt werden. Sie kann maximal 60 Minuten in einem lichtgeschützten Gefäß aufbewahrt werden.

8. TESTDURCHFÜHRUNG

Pipettierschema

Am Spektralphotometer 340 nm einstellen. Das Kinetikprogramm programmieren. Es wird empfohlen die Absorption ab der 1. Minute über 5 Minuten zu messen; Zeit zwischen den Messzyklen: 30 Sekunden.

Messung des Blanks: 1000 µl der Reaktionslösung in eine Küvette geben und auf 25 °C temperieren. Die Steigung [$\Delta A_{340}/\text{min}$] zwischen Minute 1 und Minute 5 erfassen.

Messung der Proben: 995 µl der Reaktionslösung in eine Küvette geben und auf 25°C temperieren. 5 µl des vorbereiteten Probenlysats dazugeben und gut durchmischen. Die Steigung [$\Delta A_{340}/\text{min}$] zwischen Minute 1 und Minute 5 erfassen.

Es ist darauf zu achten, dass die Steigung der Absorption [$\Delta A_{340}/\text{min}$] eine Gerade darstellt. In allen anderen Fällen muss die Probe mit SAMPLEBUF (Probenverdünnungspuffer) verdünnt und noch mal analysiert werden.

9. ERGEBNISSE

Auswertung

Die Steigung [$\Delta A_{340}/\text{min}$] ist direkt proportional zur GST Aktivität.

Blank und Probe

$$\Delta A_{340\text{nm}}/\text{min} = \frac{A_{340\text{nm}}(\text{Stop}) - A_{340\text{nm}}(\text{Start})}{\text{Reaktionszeit (min)}}$$

Die $\Delta A_{340\text{nm}}/\text{min}$ des Blanks von der $\Delta A_{340\text{nm}}/\text{min}$ der Probe abziehen. Das Ergebnis zur Berechnung der GST – Aktivität heranziehen.

GST spezifische Aktivität

$$\frac{(\Delta A_{340\text{nm}}/\text{min}) * V(\text{ml}) * \text{dil} *}{\epsilon_{\text{mM}} * V_{\text{Probe}}(\text{ml})} = \mu\text{mol/ml/min}$$

ϵ_{mM} ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) = Extinktionskoeffizient für das CDNB Konjugat bei 340 nm

Küvettentest : $9,6 \text{ mM}^{-1}$ (Schichtdicke 1 cm)

Für eine Küvette mit einer davon abweichenden Schichtdicke gilt:

$$\epsilon_{\text{mM}} = 9,6 * \text{Schichtdicke in cm}$$

V = Reaktionsvolumen (1 ml)

dil = Verdünnungsfaktor der Probe

V_{Probe} = Volumen der getesteten Probe (z.B. 0,005 ml)

10. EINSCHRÄNKUNGEN

Bei höheren Aktivitäten der GST Kontrolle oder GST Proben, Überstand mit SAMPLEBUF verdünnen und die Bestimmung wiederholen. Der Verdünnungsfaktor muss berücksichtigt werden.

11. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von kommerziell erhältlichen Kontrollen (wenn vorhanden) für die interne Qualitätskontrolle.

Wir empfehlen, die Kontrollen bei jedem Testansatz mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen ein oder mehrere Werte außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Werte nicht gewährleisten.

12. VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur für Forschungszwecke.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind giftig und karzinogen. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Reagenzien nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwenden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien vermeiden.
- Bestimmung immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich für Forschungszwecke verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurück zu senden.

15. LITERATUR

1. Mozer, T. J., et al., Purification and characterization of corn glutathione S-transferase. *Biochemistry* **22**, 1068-1072 (1983).
2. Toungh, Y. P., et al., *Drosophila* glutathione S-transferase 1-1 shares a region of sequence homology with the maize glutathione-S-transferase III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 31-35 (1990).
3. Tamaki, H., et al., Expression of two Glutathione-S-Transferasegenes in the yeast *Issatchenkia orientalis* is induced by o-dinitrobenzene during cell growth arrest. *J. Bacteriol.*, **181**, 2958-2962 (1999).
4. Piccolomini, R., et al., Glutathione transferase in bacteria: subunit composition and antigenic characterization. *J. Gen. Microbiol.*, **135**, 3119- 3125 (1989).
5. Habig, W. H., et al., Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130-7139 (1974).
6. Mannervik, B. and Danielson, U. H. Glutathione transferases - structure and catalytic activity. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **23**, 283-337 (1988).
7. Wilce, M. C. J., and Parker, M. W., Structure and function of Glutathione S-Transferases. *Biochem. Biophys. Acta*, **1205**, 1-18 (1994).

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung



Nur für Forschungszwecke

Glutathione S-Transferase (GST) Assay Kit

For the determination of GST activity in biological samples

Valid from 19.11.2007



K 2631



100



1. INTENDED USE

The Glutathione S-Transferase (GST) Assay Kit is intended for the measurement of total GST activity. It can be used to measure GST activity in cell and bacterial lysates, tissue homogenates, and in erythrocyte lysates. It is for research use only.

2. INTRODUCTION

Glutathione-S-transferases (GSTs) are a group of enzymes that are important in the detoxication of many different xenobiotics in mammals. The enzymes protect cells against toxicants by conjugating the thiol group of the glutathione to electrophilic xenobiotics, and thereby defend cells against the mutagenic, carcinogenic, and toxic effects of the compounds. GST activity was found to be present in plants, insects, yeast, bacteria, and in most mammalian tissues, especially in the liver, which plays a key role in detoxification. There are several classes of GST isoenzymes that differ in their specificity toward xenobiotic or endogenous substrates.

The Glutathione S-Transferase (GST) Assay Kit utilizes 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) which is suitable for the broadest range of GST isoenzymes. Upon conjugation of the thiol group of glutathione to the CDNB substrate, there is an increase in the absorbance at 340 nm.

Indication

- Detoxification marker

3. PRINCIPLE OF THE TEST

GST catalyzes the conjugation of L-glutathione to CDNB through the thiol group of the glutathione.



The formation of the GS-DNB conjugate is proportional to the enzyme activity and can be used for photometric GST activity determination. The rate of increase in the absorption at 340 is directly proportional to the GST activity in the sample.

One unit of GST activity is defined as the amount of enzyme producing 1 mmol of GS-DNB conjugate per minute under the conditions of the assay.

4. MATERIAL SUPPLIED

Catalogue No	Content	Kit Components	Quantity
K 2631BU	ASYBUF	GST Assay buffer	2 x 65 ml
K 2631KO	CTRL	GST Positive control	10 x 1 vial
K 2631SUB	SOL A	Substrate (CDNB)	10 x 120 µl
K 2631GSH	SOL B	L-Glutathione reduced	10 x 120 µl
K 2631PV	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer	1 x 80 ml

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Temperature controlled UV/visible spectrophotometer
- 1 ml disposable cuvette or Quartz cuvette
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 5-1000 µl
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Bidistilled water
- Standard laboratory glass or plastic vials, 1,5 ml
- Centrifuge capable of 14000 x g
- Vortex-Mixer

6. SAMPLE PREPARATION

Erythrocytes

Add **200 µl SAMPLEBUF** (Sample dilution buffer) to **50 µl of frozen EDTA whole blood sample** or **CTRL POS** (positive control), vortex for 10 sec.

Centrifuge at 14,000 x g for 10 minutes, if possible under cooling.

Collect supernatant and use for the assay.

The deep freezing of the whole blood sample und its subsequent treatment with the SAMPLEBUF (sample dilution buffer) ensures the complete lysis of the erythrocytes.

7. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- **SOL A** (Substrate), **CTRL** (control) and **SOL B** (glutathione) are stable at **-20 °C** until the expiry date stated on the label.
- Thaw **ASYBUF** (GST assay buffer) and **SAMPLEBUF** (sample dilution buffer) and bring to room temperature before use in the assay.
- Thaw **SOL A** (substrate) and **SOL B** (glutathione) and bring to room temperature immediately before use in the assay.
- **Preparation of reaction mixture for 10 determinations:**

ASYBUF	9,8 ml
SOL A	0,1 ml
SOL B	0,1 ml

The addition of SOL A may cause a light turbidity, which disappears upon carefully mixing the solution.

Note: the substrate solution must be prepared fresh before each assay series. It can be stored for maximal 60 minutes in a light protected vial.

8. ASSAY PROCEDURE

Test procedure

Set the spectrophotometer at 340 nm. On a kinetic program: read every 30 seconds over a period of 5 minutes after a lag time of 1 minute.

Blank measurement: Transfer 1000 µl of the reaction mixture solution to a cuvette, wait until a temperature of 25 °C is achieved and maintain at that temperature. Read the increase in the absorption [$\Delta A_{340}/\text{min}$] over a period of 5 minutes after a lag time of 1 minute.

Sample measurement: Add 955 µl reaction mixture solution directly to the cuvette, wait until a temperature of 25 °C is achieved and maintain at that temperature. Add 5 µl of the pre-treated sample and mix well. Read the increase in the absorption [$\Delta A_{340}/\text{min}$] over a period of 5 minutes after a lag time of 1 minute.

Pay attention, that the increase in the absorption [$\Delta A_{340}/\text{min}$] is linear. In all other cases, the sample must be diluted in SAMPLEBUF (sample dilution buffer) and re-assayed.

9. RESULTS

Calculations

The increase in absorbance [$\Delta A_{340}/\text{min}$] is directly proportional to the GST activity.

Sample and blank

$$\Delta A_{340\text{nm}}/\text{min} = \frac{A_{340\text{nm}}(\text{Stop}) - A_{340\text{nm}}(\text{Start})}{\text{Reaction time (min)}}$$

Subtract the $\Delta A_{340\text{nm}}/\text{min}$ of the blank from the $\Delta A_{340\text{nm}}/\text{min}$ of the sample. Use this rate for the calculation of the GST specific activity.

Equation for the GST specific activity

$$\frac{(\Delta A_{340\text{nm}}/\text{min}) * V (\text{ml}) * \text{dil} *}{\epsilon_{\text{mM}} * V_{\text{sample}} (\text{ml})} = \mu\text{mol/ml/min}$$

Where:

ϵ_{mM} ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) = The extinction coefficient for CDNB conjugate at 340 nm

For a cuvette: $9,6 \text{ mM}^{-1}$ (path length 1 cm)

For a cuvette with a different path length, the coefficient should be calculated using this substitution factor:

$$\epsilon_{\text{mM}} = 9,6 * \text{path length in cm}$$

V = the reaction volume (1 ml)

dil = the dilution factor of the original sample

V_{sample} = the volume of the enzyme sample tested (e.g. 0.005 ml)

10. LIMITATIONS

If the GST control or GST sample is too concentrated, it must be diluted with SAMPLEBUF prior to the assay. The dilution factor must be considered.

11. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG recommends the use of commercial control samples for internal quality control if available.

Control samples should be analyzed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid, if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

12. PRECAUTIONS

- For research use only.
- Quality control guidelines should be observed.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- Substrate solution should remain colorless until use.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- All reagents in the kit package are for research use only.
- Guidelines for medical laboratories should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product shall be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Mozer, T. J., et al., Purification and characterization of corn glutathione S-transferase. *Biochemistry* **22**, 1068-1072 (1983).
2. Toung, Y. P., et al., *Drosophila* glutathione S-transferase 1-1 shares a region of sequence homology with the maize glutathione-S-transferase III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 31-35 (1990).
3. Tamaki, H., et al., Expression of two Glutathione-S-Transferasegenes in the yeast *Issatchenkia orientalis* is induced by o-dinitrobenzene during cell growth arrest. *J. Bacteriol.*, **181**, 2958-2962 (1999).
4. Piccolomini, R., et al., Glutathione transferase in bacteria: subunit composition and antigenic characterization. *J. Gen. Microbiol.*, **135**, 3119-3125 (1989).
5. Habig, W. H., et al., Glutathione S-transferase. The fist enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130-7139 (1974).
6. Mannervik, B. and Danielson, U. H. Glutathione transferases - structure and catalytic activity. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **23**, 283-337 (1988).
7. Wilce, M. C. J., and Parker, M. W., Structure and function of Glutathione S-Transferases. *Biochem. Biophys. Acta*, **1205**, 1-18 (1994).

11/20/2007 26012005_GST.DOC

Used symbols:

Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number



For research use only