

谷丙转氨酶 (ALT/GPT) 测试盒

(货号: BC008 微板法)

一、测定原理:

谷丙转氨酶 (ALT) 在37℃及PH7.4条件下, 作用于丙氨酸及 α -酮戊二酸组成的底物, 生成丙酮酸及谷氨酸。反应30min后 (固定时间) 加入2,4-二硝基苯肼 (DNPH) 盐酸溶液, 既中止反应, 同时DNPH与酮酸中羰基加成, 生成丙酮酸苯腙。苯腙在碱性条件下呈红棕色, 于505nm比读吸光度并计算酶活力。

二、试剂的组成与配制: (96T)

试剂一:谷丙转氨酶基质液,5mL×1瓶, 4℃冰箱保存6个月;

试剂二:2,4—二硝基苯肼液,5mL×1瓶, 4℃冰箱保存6个月;

试剂三:4mol/L氢氧化钠液,5mL×1瓶, 室温密封保存6个月;

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。

试剂四:2 μ mol/mL丙酮酸钠标准液×1支, 4℃冰箱保存6个月;

试剂五:0.1mol/L磷酸盐缓冲液×1支, 4℃冰箱保存6个月。

三、操作过程:

1、样本前处理:

①、血清 (浆) 及其它液体样本待测: 直接测定。

②、动物组织样本: 准确称取组织重量, 按重量 (g): 体积(mL)=1:9的比例, 加入9倍体积的生理盐水, 冰水浴条件下机械匀浆, 2500转/分, 离心10分钟, 取上清液待测。

③、培养细胞样本前处理: 将收集好的细胞用等渗缓冲液 (推荐 0.1mol/L pH7~7.4磷酸盐缓冲液或生理盐水) 清洗1~2次; 1000转/分,离心10分钟,弃上清,留细胞沉淀, 加入匀浆介质 (推荐加入 0.1mol/L且pH7~7.4的磷酸盐缓冲液或生理盐水), 冰水浴条件下超声破碎或手动匀浆, 制备好的匀浆液不离心, 待测。

2、操作表:

	测定孔	对照孔
基质液 (μ L) 37℃已预温	20	20
待测样本 (μ L)	5	
37℃反应30分钟 (测定孔每吸取一个样本, 将吸嘴伸入孔板底部基质液中, 反复吸打混匀,但注意不要吸入气泡)		
2, 4—二硝基苯肼液 (μ L)	20	20
待测样本 (μ L)		5
37℃反应20分钟 (对照孔每吸取一个样本, 将吸嘴伸入孔板底部液体中, 反复吸打混匀, 但注意不要吸入气泡)		
0.4mol/L氢氧化钠液 (μ L)	200	200
轻轻水平摇动96孔板混匀, 室温放置15分钟, 波长510nm, 酶标仪测定各孔OD值, 以绝对OD值(测定孔OD值减去对照孔OD值), 查标准曲线, 求得相应的ALT/GPT活力单位。		



四、注意点：

- 1、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液体，反应液总容量3mL，波长340nm，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为一个单位（1卡门氏单位=0.482 U/L，25℃）。
- 2、一般血清标本内源性酮酸很少，血清对照孔吸光度值接近试剂空白孔（以双蒸水代替血清，其他和对照孔同样操作）。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孔，以试剂空白孔代替即可，但对脂血、黄疸或溶血血清，每份标本应作对照孔。
- 3、酶活力超过150卡门氏单位时，用生理盐水稀释血清后重测。
- 4、应将一般血清的对照孔（或称标本空白孔）的吸光度作为日常质控的指标之一；如相差大，可考虑α-酮戊二酸浓度、DNPH浓度及仪器等原因引起。
- 5、血清中ALT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。

附录 I：ALT标准曲线

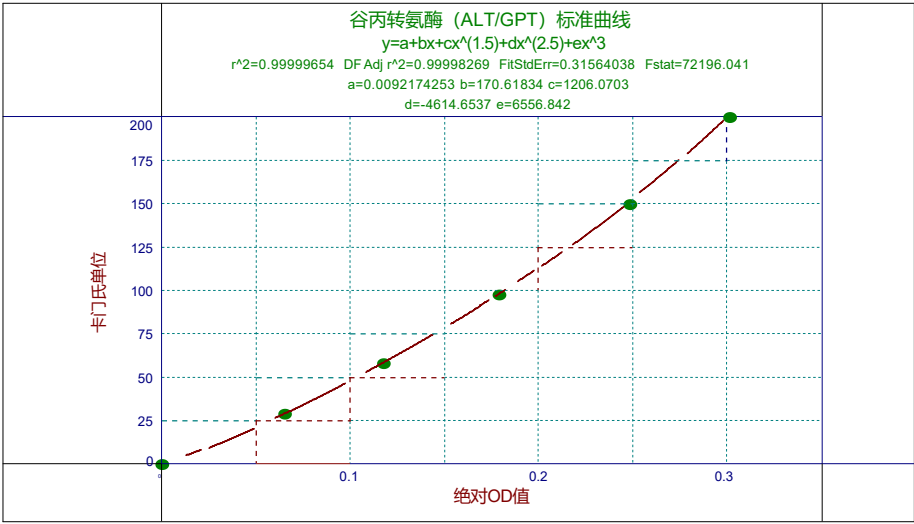
一、操作表:

孔号	0	1	2	3	4	5
0.1mol/L磷酸缓冲液（μL）	5	5	5	5	5	5
2μmol/mL丙酮酸钠标准液（μL）	0	2	4	6	8	10
基质缓冲液（μL）	20	18	16	14	12	10
2,4—二硝基苯胼液（μL）	20	20	20	20	20	20
37℃反应20分钟 (每孔试剂加完，将吸嘴伸入孔板底部液体中，反复吸打混匀，但注意不要吸入气泡)						
0.4mol/L氢氧化钠液（μL）	200	200	200	200	200	200
轻轻水平摇动96孔板混匀，室温放置15分钟，波长510nm，酶标仪测定各孔OD值，各孔吸光度减去零孔吸光度，所得差值=绝对OD值作为横坐标，相应的卡门氏单位为纵坐标，作坐标图拟合公式，直接在Excel表中用公式计算样本中的ALT酶活性。						

二、测定结果(附参考标准曲线)

实验的吸光度值	0.2169	0.2819	0.334	0.3957	0.4651	0.5189
实验的绝对吸光度值	0	0.065	0.1171	0.1788	0.2482	0.301
相当于酶活力卡门氏单位	0	28	57	97	150	200

作图如下:



【注】：标准曲线需要客户自己制作才更准确，操作步骤参照上述操作表；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己按操作表求得的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。

附录 II：组织中ALT测定

一、样本前处理：

准确称取组织重量,按重量(g):体积(mL)=1:9的比例,加入9倍体积的生理盐水,冰水浴条件下机械匀浆,制成10%的组织匀浆,2500转/分,离心10分钟,取上清液,再用生理盐水稀释到适宜浓度(通过标准曲线后计算得匀浆液卡门氏单位值小于150)待测。(取部分上清液测蛋白浓度)

二、操作表：

	测定孔	对照孔
基质液（μL） 37℃已预温	20	20
待测样本（μL）	5	
37℃反应30分钟 (测定孔每吸取一个样本，将吸嘴伸入孔板底部基质液中，反复吸打混匀,但注意不要吸入气泡)		
2，4—二硝基苯肼液（μL）	20	20
待测样本（μL）		5
37℃反应20分钟 (对照孔每吸取一个样本，将吸嘴伸入孔板底部液体中，反复吸打混匀,但注意不要吸入气泡)		
0.4mol/L氢氧化钠液（μL）	200	200
轻轻水平摇动96孔板混匀，室温放置15分钟，波长510nm，酶标仪测定各孔OD值，以绝对OD值(测定孔OD值减去对照孔OD值)，查标准曲线，求得相应的ALT/GPT活力单位。		

三、计算公式及举例：

①、计算公式：

$$\text{组织中ALT活力 (U/gprot)} = \frac{\text{代入标准曲线得 ALT活力 (卡门氏单位)}}{0.482} \times 0.482 \div \text{Cpr}$$

0.482:卡门氏单位到U/L的换算

Cpr:组织匀浆蛋白浓度,gprot/L(prot指蛋白)

②、计算举例：

取中华鲟部分肝组织按重量体积比1:9制备成10%匀浆，再用生理盐水稀释到0.5%的匀浆取5μL在96孔板上按上述操作表进行操作，酶标仪510nm测得测定孔OD值为0.3041，对照孔OD值为0.2242，同时测得0.5%中华鲟肝匀浆蛋白浓度为0.3311gprot/L，得绝对OD值=测定孔OD减去对照孔OD值=0.079，代入标准曲线所得拟合公式中得：

$$\begin{aligned} \text{组织中ALT活力 (U/gprot)} &= 35.8979 \times 0.482 \div 0.3311 \\ &= 52.2585 \text{U/gprot} \end{aligned}$$

附录III：血清（浆）中ALT测定

一、前处理：

血清(浆)直接取样进行测定。（若酶活力超过150卡门氏单位时，需用生理盐水稀释血清后重新测定）

二、操作表：

	测定孔	对照孔
基质液（μL）37℃已预温	20	20
待测样本（μL）	5	
37℃反应30分钟 (测定孔每吸取一个样本，将吸嘴伸入孔板底部基质液中，反复吸打混匀,但注意不要吸入气泡)		
2，4—二硝基苯胍液（μL）	20	20
待测样本（μL）		5
37℃反应20分钟 (对照孔每吸取一个样本，将吸嘴伸入孔板底部液体中，反复吸打混匀,但注意不要吸入气泡)		
0.4mol/L氢氧化钠液（μL）	200	200
轻轻水平摇动96孔板混匀，室温放置15分钟，波长510nm，酶标仪测定各孔OD值，以绝对OD值(测定孔OD值减去对照孔OD值)，查标准曲线，求得相应的ALT/GPT活力单位。		

三、计算举例：

取某人血清5μL在96孔板上按上述操作表进行，酶标仪510nm测得测定孔OD值为0.2541，对照孔OD值为0.2215，得绝对OD值=测定孔OD值减去对照孔OD值=0.0326，代入标准曲线所得拟合公式中得：血清中ALT活力=12.0121卡门氏单位=5.7898 U/L。