

谷丙转氨酶/丙氨酸氨基转氨酶(GPT/ALT)试剂盒说明书

(货号: ADS-W-AJS001-96 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

丙氨酸氨基转氨酶, 旧称谷丙转氨酶, 缩写为 ALT 或 GPT (EC 2.6.1.2) 广泛存在于动植物、微生物和培养细胞中, 催化氨基酸和酮酸转氨基反应, 在氨基酸代谢中具有重要作用。

谷丙转氨酶/丙氨酸氨基转氨酶(GPT/ALT)催化丙氨酸和 α -酮戊二酸发生转氨基反应, 生成丙酮酸和谷氨酸; 加入 2,4-二硝基苯肼溶液, 不仅终止上述反应, 而且与丙酮酸反应形成丙酮酸二硝基苯腙, 在碱性溶液中显棕红色。通过在 520nm 读取吸光值并计算出该酶活力大小。

二、试剂盒组成和配制:

| 试剂组分 | 试剂规格 | 存放温度 |
|------|--------------|--------|
| 提取液 | 液体 100mL×1 瓶 | 4℃保存 |
| 试剂一 | 液体 4mL×1 瓶 | 4℃保存 |
| 试剂二 | 液体 4mL×1 瓶 | 4℃避光保存 |
| 试剂三 | 液体 40mL×1 瓶 | 4℃保存 |
| 标准品 | 粉体 1 支 | 4℃保存 |

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

① 组织样本:

取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量(g):试剂一体积(mL)为 1:5~10 的比例提取。

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞(冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌或细胞数量(10^4 个):提取液体积(mL)为 500~1000:1 的比例提取。

③ 血清(浆)样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机测定:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 520nm。

② 可先做 2 个样本预测定, 熟悉操作过程, 并依据测出的吸光值 A 是否超出标准曲线的线性范围来做调整。

③ 所有试剂可于 37℃孵育 5-10min, 在 96 孔板中依次加入:

| 试剂组分 (μ L) | 测定管 | 对照管 |
|-------------------|-----|-----|
| 样本 | 10 | |
| 试剂一 | 20 | 20 |
| 混匀, 于 37℃孵育 30min | | |
| 试剂二 | 20 | 20 |

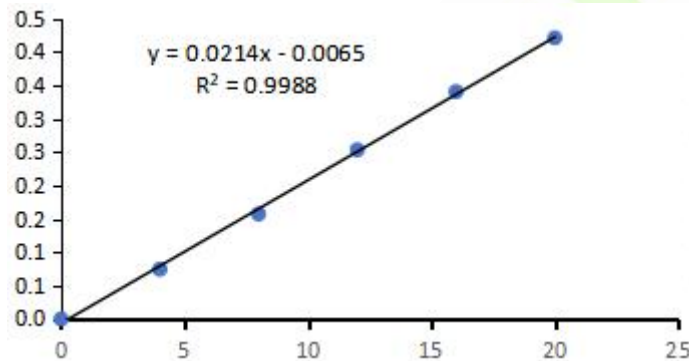
| | | |
|--|-----|-----|
| 样本 | | 10 |
| 混匀，于 37°C 孵育 10min | | |
| 试剂三 | 200 | 200 |
| 混匀，25°C 孵育 10min，于 520nm 处测定吸光值 A， ΔA=A 测定-A 对照（每个样本做一个自身对照）。 | | |

【注】1.若 A 测定超过 1.2，可降低样本量 V1（如 5μL，另外 5μL 用蒸馏水补齐，总体积 10μL 保持不变）。则改变后的加样体积 V1 需代入计算公式重新计算。

2.若 ΔA 的值在零附近徘徊，则可增加样本量 V1（如 15μL，则试剂一相应减少），或增加样本取样质量（W），则改变后的加样体积 V1 和取样质量 W 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.0214x - 0.0065$ ，x 为标准品摩尔质量（nmol）；y 是 ΔA。



2、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1 nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{GPT/ALT}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0065) \div 0.0214] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 155.8 \times (\Delta A + 0.0065) \div \text{Cpr}$$

3、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟催化产生 1nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{GPT/ALT}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0065) \div 0.0214] \div (W \times V1 \div V) \div T = 155.8 \times (\Delta A + 0.0065) \div W$$

4、按细菌或细胞密度计算：

酶活定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 1nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{GPT/ALT}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0065) \div 0.0214] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.312 \times (\Delta A + 0.0065)$$

5、血清（浆）活力计算

酶活定义：每毫升血清（浆）每分钟催化产生 1nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{GPT/ALT}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0065) \div 0.0214] \div V1 \div T = 155.8 \times (\Delta A + 0.0065)$$

V---提取液体积，1 mL；

V1---反应体系中样本体积，0.01mL；

T---反应时间，30 min；

W---样本质量，g；

500---细胞或细菌总数，万；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

1 加 1mL 蒸馏水溶解标准品，充分混匀，标准品母液浓度为 20μmol/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2μmol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

| | | | | | | |
|--|---|-----|-----|-----|-----|---|
| 吸取标准品母液 100uL，加入 900uL 蒸馏水，混匀得到 2μmol/mL 的标品稀释液待用。 | | | | | | |
| 标品浓度 | 0 | 0.4 | 0.8 | 1.2 | 1.6 | 2 |

| | | | | | | |
|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| μmol/mL | | | | | | |
| 标品稀释液 uL | 0 | 40 | 80 | 120 | 160 | 200 |
| 水 uL | 200 | 160 | 120 | 80 | 40 | 0 |
| 各标准管混匀待用。 | | | | | | |

3 依据加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

| 试剂名称 (μL) | 标准管 | 0 浓度管 (仅做一次) |
|--|-----|--------------|
| 标品 | 10 | |
| 蒸馏水 | | 10 |
| 试剂一 | 20 | 20 |
| 试剂二 | 20 | 20 |
| 混匀，于 37°C 孵育 10min | | |
| 试剂三 | 200 | 200 |
| 混匀，25°C 孵育 10min，于 520nm 处测定吸光值 A， ΔA=A 测定-0 浓度管。 | | |