



丙氨酸氨基转移酶(ALT)活性检测试剂盒(微板法)

货号: R28933

产品简介:

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。哺乳动物肝细胞内的 ALT 浓度远高于血清, 当肝细胞坏死, ALT 释放到血液中, 血清 ALT 活性显著增高。因此, ALT 被世界卫生组织推荐为肝功能损害最敏感的检测指标。

本产品的检测原理是 ALT 催化丙氨酸与 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。

产品组成:

试剂名称	规格	保存要求
提取液	100mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂一	4mL×1 支	4℃ 保存
试剂二	4mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂三	40mL×1 瓶	4℃ 保存
标准品	粉末×1 支	4℃ 保存

使用方法:

建议正式实验前, 选取 2 个样本做预测定, 了解实验样品情况, 熟悉流程, 避免样本和试剂浪费。

一、样本准备:

1. 组织样本:

(a) 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆;

(b) 12000rpm 4℃ 离心 10min 后取上清, 置于冰上待测。



【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例进行提取。

2. 细胞/细菌样本：

(a) 先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；

(b) 取约 5×10^6 个细菌或细胞加入 1mL 提取液；超声波破碎细菌或细胞（冰浴，200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；

(c) 12000rpm 4℃ 离心 10min 后取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，按照每 $0.5 \sim 1 \times 10^7$ 个细菌/细胞加入 1mL 提取液进行提取。

3. 血清（浆）样本：

直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

二、样品测定：

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：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
S 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℃ 孵育 10min		
试剂三	200	200
混匀，25℃ 孵育 10min，于 520nm 处测定吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本做一个自身对照)。		

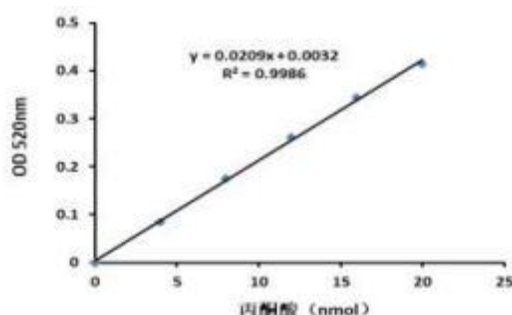
【注】1. 若 A 测定超过 1.2，可降低样本量 V1（如 5μL，另外 5μL 用蒸馏水补齐，总体积 10μL 保持不变）。则改变后的加样体积 V1 需代入计算公式重新计算。



2. 若 ΔA 的值在零附近徘徊, 则可增加样本量 V_1 (如 $15\mu\text{L}$, 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 V_1 和取样质量 W 需代入计算公式重新计算。

三、含量计算

1. 标准曲线方程: $y = 0.0209x + 0.0032$, 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。

$$\begin{aligned} \text{GPT/ALT}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A - 0.0032) \div 0.0209] \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 159.5 \times (\Delta A - 0.0032) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{GPT/ALT}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A - 0.0032) \div 0.0209] \div (W \times V_1 \div V) \div T \\ &= 159.5 \times (\Delta A - 0.0032) \div W \end{aligned}$$

4. 按细菌或细胞数量计算:

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。

$$\begin{aligned} \text{GPT/ALT}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A - 0.0032) \div 0.0209] \div (500 \times V_1 \div V) \div T \\ &= 0.32 \times (\Delta A - 0.0032) \end{aligned}$$

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。



$$\text{GPT/ALT}(\text{nmol/min/mL})=[(\Delta A-0.0032)\div 0.0209]\div V1\div T=159.5\times(\Delta A-0.0032)$$

V---加入提取液体积, 1 mL

V1---加入样本体积, 0.01mL

T---反应时间, 30 min

W---样品质量, g

500---细胞或细菌总数, 万

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL

附: 标准曲线制作过程:

1. 制备标准品母液 (20 $\mu\text{mol/mL}$): 加 1mL 蒸馏水溶解标准品, 充分混匀。
2. 把母液稀释成以下浓度: 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2 $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际来调整浓度。
3. 10 μL 标准品+20 μL 试剂一+20 μL 试剂二, 混匀, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10min ; 再加 200 μL 试剂三, 混匀, 25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10min, 于 520nm 处测定吸光值 A, 依据结果即可制作标准曲线。

注意事项:

- 1、 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品。
- 2、 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: 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 保存六个月。