

液体样本丙氨酸氨基转移酶（谷丙转氨酶）ALT/GPT 活性检测试剂盒（赖氏法） E2021

描述: 丙氨酸氨基转移酶又称谷丙转氨酶、谷氨酸转氨酶、丙氨酸氨基转换酶，英文名：Alanine aminotransferase（简称 ALT）或 Glutamate pyruvate transaminase（简称 GPT）。主要存在于肝细胞浆内，正常情况下，细胞内浓度高于血清中 1000-3000 倍。只要有 1% 的肝细胞被破坏，就可以使血清酶增高一倍。谷丙转氨酶（ALT）被世界卫生组织推荐为肝功能损害最敏感的检测指标。谷丙转氨酶还存在于心脏和骨骼肌中。本试剂盒可以检测血清、血浆、或组织匀浆液上清等生物样品中的 ALT 活性。

原理: 试剂盒采用赖氏法进行 ALT 活性检测。丙氨酸氨基转移酶（ALT/GPT）能催化丙氨酸与酮戊二酸生成谷氨酸和丙酮酸，后者在酸性条件下与显色剂（2, 4-二硝基苯肼）作用生成丙酮酸二硝基苯腙，其在碱性条件下呈棕红色，颜色深浅可以反映酶活性高低。

适用范围: 本试剂盒可以检测血清、血浆或组织匀浆液上清中的谷丙转氨酶的活性。

组成: (微板法 200 次)

组分	规格	保存条件
丙酮酸标准品	1ml	-20℃避光保存
底物缓冲液	10ml	4℃避光保存
PB 缓冲液	1ml	4℃保存
显色剂: 2, 4-二硝基苯肼溶液	10ml	4℃避光保存
终止试剂	100ml	常温保存

储存: 以上组分按要求保存，6 个月有效。

操作步骤:

一. 样品准备: (以血清为例)

收集血液，室温静置 2h，4℃过夜，600g 离心 10 分钟，移取上清至另一新的离心管中，4℃保存备用。（如果超出线性范围，可以适当生理盐水稀释后再测定）

二. 酶活力测定:

1. 丙酮酸标准品工作液的配制:按下表用底物缓冲液和 PB 缓冲液将丙酮酸标准品稀释成 0、1.1ug、2.2ug、3.3ug、4.4ug、5.5ug 七个浓度，充分混匀。丙酮酸 0 浓度孔只加底物缓冲液和 PB 缓冲液，以此作为空白孔调零，按照下述操作步骤操作，然后在 520nm 处读吸光度 OD 值，绘制标准曲线。

使用分光光度计测定，丙酮酸标准品工作液稀释比例:

PB 缓冲液 (ul)	10	10	10	10	10	10
底物缓冲液 (ul)	50	45	40	35	30	25
丙酮酸标准品 (ul)	0	5	10	15	20	25
对应丙酮酸微克数	0	1.1	2.2	3.3	4.4	5.5

使用酶标仪测定，丙酮酸标准品工作液稀释比例：

PB 缓冲液 (ul)	4	4	4	4	4	4
底物缓冲液 (ul)	20	18	16	14	12	10
丙酮酸标准品 (ul)	0	2	4	6	8	10
对应丙酮酸微克数	0	0.44	0.88	1.32	1.76	2.2

2. ALT 活性测定：

参照下表使用分光光度计进行操作。

	丙酮酸标准品工作液	样本管	样本对照管	空白管
样本 (ul)	--	10	10	--
标准品工作液 (ul)	60	--	--	--
蒸馏水 (ul)	--	--	--	10
底物缓冲液 (ul)	--	50	---	--
充分混匀，37℃，孵育 30 分钟				
显色剂；2,4-二硝基苯肼溶液 (ul)	50	50	50	50
底物缓冲液 (ul)	--	--	50	50
充分混匀，37℃，孵育 20 分钟				
终止试剂 (ul)	500	500	500	500
充分混匀，室温静置 10 分钟，于波长 520nm 使用分光光度计测定各标准品和样本管吸光度值,注意设置样品空白管。				

使用酶标仪测定反应体系：

	丙酮酸标准品工作液	样本管	样本对照管	空白管
样本 (ul)	--	4	4	--
标准品工作液 (ul)	24	--	--	--
蒸馏水 (ul)	--	--	--	4
底物缓冲液 (ul)	--	20	---	--
充分混匀，37℃，孵育 30 分钟				
显色剂；2,4-二硝基苯肼溶液 (ul)	20	20	20	20
底物缓冲液 (ul)	--	--	20	20
充分混匀，37℃，孵育 20 分钟				
终止试剂 (ul)	200	200	200	200

充分混匀, 室温静置 10 分钟, 于波长 520nm 酶标仪测定各标准品和样本管吸光度值, 注意设置样品空白管。

三、ALT 酶活力计算:

以丙酮酸微克数为 x 轴, 测得的吸光度 OD 值为 y 轴, 绘制标准曲线, 根据标准曲线计算样本对应的丙酮酸质量, 然后根据 ALT 酶活力单位计算公式, 计算 ALT 酶活性。

酶标仪测定, ALT 酶活力:

未稀释样本 ALT 酶活力 = (样本管丙酮酸微克数-样本对照管丙酮酸微克数) × 250/2.5

稀释样本 ALT 酶活力 = (样本管丙酮酸微克数-样本对照管丙酮酸微克数) × 稀释倍数 × 250/2.5

分光光度计测定时, ALT 酶活力:

未稀释样本 ALT 酶活力 = (样本管丙酮酸微克数-样本对照管丙酮酸微克数) × 100/2.5

稀释样本 ALT 酶活力 = (样本管丙酮酸微克数-样本对照管丙酮酸微克数) × 稀释倍数 × 100/2.5

ALT 酶活力单位定义: 每毫升样本在 37℃ 与底物作用 30min 后, 能产生 2.5ug 的丙酮酸为一个丙氨酸氨基转移酶活力单位。

说明:

- 1、谷丙转氨酶的正常参考值为 0~40U。高于 40U 即称为谷丙转氨酶升高
- 2、标准曲线上数值在 20~100U 是准确可靠的, 超过 200 U 时, 需将样品稀释。
- 3、溶血标本不宜使用, 因血细胞内转氨酶活力较高, 会影响测定结果。