

# 组织细胞丙氨酸氨基转移酶（谷丙转氨酶）ALT/GPT 活性检测试剂盒（赖氏法） E2022

**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。本试剂盒可以检测实体组织、培养细胞等生物样品中的 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：**本试剂盒可以检测组织或培养细胞中的丙氨酸氨基转移酶的活性。

**组成：**（105 次）

组分	规格	保存条件
组织细胞裂解液	100ml	4℃保存
丙酮酸标准品	0.6ml	-20℃避光保存
底物缓冲液	6ml	4℃避光保存
PB 缓冲液	0.6ml	4℃保存
显色剂：2，4-二硝基苯肼溶液	6ml	4℃避光保存
终止试剂	60ml	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：

1、动物用生理盐水(0.9% NaCl, 含有 0.16mg/ml 肝素钠) 灌流清除血液后获取组织样品。按照 100mg 组织加入 500ul-1000ul, 4℃或冰浴预冷组织细胞裂解液,使用玻璃匀浆器或电动匀浆器等 4℃或冰浴匀浆。随后 4℃ 12000rpm 离心 5min, 取上清, 部分进行蛋白定量(普利莱 BCA 法蛋白定量试剂盒 P1511)。

2、收集细胞, 按照每  $10^7$  个细胞加入 500ul-1000ul, 4℃或冰浴预冷组织细胞裂解液,使用玻璃匀浆器或电动匀浆器等 4℃或冰浴匀浆。随后 4℃ 12000rpm 离心 5min, 取上清, 部分进行蛋白定量(普利莱 BCA 法蛋白定量试剂盒 P1511)。

### 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, 而后在 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, 建议以蛋白浓度进行校正。

#### 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。