

谷丙转氨酶（ALT/GPT）测试盒说明书(精简版)

(货号：C009-2-1 微板法 96T)

免责声明：测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验,否则由此导致的后果用户自行承担!

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：(试剂盒有效期 6 个月)

- 试剂一:谷丙转氨酶基质液,5mL×1 瓶，4℃ 保存；
- 试剂二:2,4—二硝基苯肼液,5mL×1 瓶，4℃ 保存；
- 试剂三:4mol/L 氢氧化钠液,5mL×1 瓶，室温密封保存；临用时按 4mol/L 氢氧化钠液:双蒸水=1：9 的比例配成 0.4mol/L 氢氧化钠液，需多少配多少，室温密封保存。
- 试剂四:2μmol/mL 丙酮酸钠标准液×1 支，4℃ 保存；
- 试剂五:0.1mol/L 磷酸盐缓冲液×1 支，4℃ 保存。

三、所需仪器及试剂：

可调 505nm 波长的酶标仪，蒸馏水，37℃ 水浴锅或恒温箱，蛋白测定试剂（组织或细胞用，本公司有售）。

四、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、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,冰水浴条件下匀浆,制成 10%的组织匀浆,2500 转/分,离心 10 分钟,取上清液用生理盐水稀释到适宜浓度(通过标准曲线计算得匀浆液卡门氏单位值小于 150)待测。(另取部分上清液测蛋白浓度,蛋白定量试剂盒本所有售)
- 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（μL）37℃预温	20	20
待测样本（μL）	5	
轻轻震荡孔板混匀，37℃反应 30 分钟		
2，4—二硝基苯肼液（μL）	20	20
待测样本（μL）		5
轻轻震荡孔板混匀，37℃反应 20 分钟		
0.4mol/L 氢氧化钠液（μL）	200	200
轻轻震荡孔板混匀，室温放置 15 分钟，波长 505nm，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)，代入标准曲线（参考附录 I），求得相应的 ALT/GPT 活力值。		

五、计算：

1、血清（浆）等液体样本计算方法：

$$\text{ALT 活力 (U/L)} = \frac{\text{代入标准曲线得}}{\text{ALT 活力 (卡门氏单位)}} \times 0.482 \times \text{N}$$

0.482:卡门氏单位到 U/L 的换算;

N：样本测试前稀释倍数。

2、组织、细胞类样本计算方法：

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

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)。

六、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（可以通过预试结果来判定）时可以双蒸水代替血清作对照孔。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 标准曲线制作

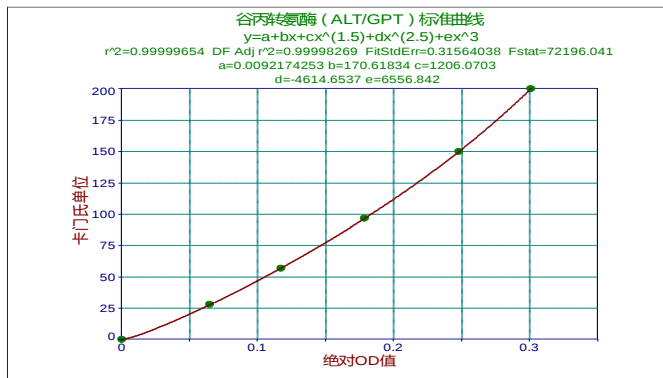
1、操作表：

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—二硝基苯肼液（μL）	20	20	20	20	20	20
轻轻震荡孔板混匀，37℃反应 20 分钟						
0.4mol/L 氢氧化钠液（μL）	200	200	200	200	200	200
轻轻震荡孔板混匀，室温放置 15 分钟，波长 505nm，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。						

2、测定结果(附参考标准曲线)

本所实验的吸光度值	0.2169	0.2819	0.334	0.3957	0.4651	0.5189
本所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：（标曲拟合后公式有很多种，下面选择一种作为参考）



【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各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。