

组织及血液谷丙转氨酶（ALT）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AMHD3-C24	组织及血液谷草转氨酶（AST）试剂盒	24T	常量法

产品说明：

谷丙转氨酶又叫丙氨酸氨基转移酶（EC 2.6.1.2），广泛存在于动物、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。此外，哺乳动物肝细胞GPT活性很高，当肝细胞坏死，GPT释放到血液中，血清GPT活性显著增高。因此，GPT被世界卫生组织推荐为肝功能损害最敏感的检测指标。

GPT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，而且与酮酸中的羰基加成，生成丙酮酸苯腙；苯腙在碱性条件下呈红棕色，可以在505nm读取吸光值并计算酶活性。

试剂组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 30 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂一	粉剂×2 支	2-8℃ 保存
试剂二	液体 8 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂三	液体 80 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8℃ 保存

溶液的配制：

- 1、试剂一：同时提供两个8 mL 棕瓶；临用前取一支试剂一倒入一个空瓶中，用4 mL 蒸馏水溶解，再用溶液将试剂一残留试剂润洗下来，2-8℃ 保存4 周；该试剂为冻干试剂，可能存在肉眼观察试剂量相差较大甚至量很少的现象，此现象不影响使用，实际质量相同；
- 2、标准品：20 $\mu\text{mol/mL}$ 丙酮酸钠溶液。

操作步骤：

一、样本处理

- 1、细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（ 10^6 个）：提取液体积（mL）为5~10：1 的比例（建议5 百万细菌或细胞加入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）；3500g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。
- 2、组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为1：5~10 的比例（建议称取约0.1g 组织，加入1mL 提取液），进行冰浴匀浆。3500g，4℃离心10min，取上清，置冰上待测。
- 3、血清（浆）样本：直接检测。若有浑浊离心取上清使用。

二、测定步骤

- 1、分光光度计预热30min以上，调节波长至505nm，蒸馏水调零。
- 2、标准曲线的稀释：将20 $\mu\text{mol/mL}$ 丙酮酸钠溶液用蒸馏水稀释至1、0.8、0.6、0.4、0.2、0.1、0.05、0 $\mu\text{mol/mL}$ （0即为空白管）。

3、标准品稀释表:

序号	稀释前浓度(μmol/mL)	标准液体积(μL)	蒸馏水体积(μL)	稀释后浓度(μmol/mL)
1	20	50	950	1
2	1	200	50	0.8
3	1	150	100	0.6
4	1	200	300	0.4
5	0.4	250	250	0.2
6	0.2	250	250	0.1
7	0.1	250	250	0.05
8 (空白管)	-	-	250	0

备注: 实验中每个标准管需 120μL 标准品 (注意不要在此步骤直接检测吸光值)。

4、在EP管中加入下列试剂:

试剂名称(μL)	测定管	对照管	标准管
待测样本	20	-	-
试剂一	100	100	-
标准品	-	-	120
混匀后, 37°C 反应30min			
试剂二	100	100	100
待测样本	-	20	-
混匀后, 37°C 反应20min			
试剂三	1000	1000	1000
混匀, 常温放置10min, 吸取反应液于505nm波长处测定吸光度, 记为A测定管、A对照管、A标准管和A空白管 (即0μmol/mL标准点), 计算ΔA标准= A标准管-A空白管, ΔA= A测定管-A对照管。标准曲线只需做1-2次。			

三、GPT 活性计算

1. 标准曲线的绘制:

以各标准品浓度为x轴, 以ΔA标准为y轴做标准曲线, 得到方程 $y=kx+b$ 。将ΔA带入方程求x值(μmol/mL)。

2. GPT活性计算:

(1) 按样本质量计算:

单位定义: 每小时每g样本催化产生1μmol丙酮酸的量为一个GPT活性单位。

$$\text{GPT活性 (U/g 质量)} = x \times (V_{\text{样本}} + V_{\text{试剂一}}) \div (W \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times F = 12x \div W \times F$$

(2) 按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每小时每mg组织蛋白催化产生1μmol丙酮酸的量为一个GPT活性单位。

$$\text{GPT活性 (U/mg prot)} = x \times (V_{\text{样本}} + V_{\text{试剂一}}) \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样本}}) \div T \times F = 12x \div C_{\text{pr}} \times F$$

3) 按血清体积计算:

单位定义: 每小时每mL血清样本催化产生1μmol丙酮酸的量为一个GPT活性单位。

$$\text{GPT活性 (U/mL)} = x \times (V_{\text{样本}} + V_{\text{试剂一}}) \div V_{\text{样本}} \div T \times F = 12x \times F$$

(4) 按细胞或细菌数量计算:

单位定义: 每小时每 10^6 个细胞或细菌催化产生1μmol丙酮酸的量为一个GPT活性单位。

$$\text{GPT活性 (U/10}^6 \text{ cell)} = x \times (V_{\text{样本}} + V_{\text{试剂一}}) \div (N \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times F = 12x \div N \times F$$

V样本: 样本体积, 0.02mL; V试剂一: 试剂一体积, 0.1mL; V样总: 提取液体积, 1mL; W: 样本质量, g; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; T: 反应时间, 0.5h; N: 细胞或细菌总数, 以百万计; F: 样本稀释倍数。