**丙氨酸氨基转移酶/谷丙转氨酶(GPT/ALT)测定试剂盒说明书(货号:PYB2048,规格:96T)**

1. **实验原理：**

 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。

1. **试剂组份**：

 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

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

1. **使用步骤：**

 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/LpH7**～**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。

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。 |

血清（浆）等液体样本计算方法：

AST(U/L)=代入标准曲线得AST活力（卡门氏单位）×0.482×N

0.482:卡门氏单位到U/L的换算;

N：样本测试前稀释倍数

组织、细胞类样本计算方法：

AST活力（U/gprot）=代入标准曲线得AST活力（卡门氏单位）×0.482÷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)。

注意事项：

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=0.482U/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。

ALT 标准曲线制作:

1.操作表:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 孔号 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 0.1mol/L 磷酸缓冲液（μL）  | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 2μmol/mL 丙酮酸钠标准液（μL） | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 |
| 基质缓冲液（μL）  | 20 | 18 | 16 | 14 | 12 |
| 2,4—二硝基苯肼液（μL）  | 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 |
| 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 | 0.283 | 0.337 | 0.404 | 0.46 | 0.526 | 0.567 |
| 本所实验的绝对吸光度值  | 0.000  | 0.054  | 0.121  | 0.177  | 0.243  | 0.284  |
| 相当于酶活力卡门氏单位  | 0 | 28 | 57 | 97 | 150 | 200 |