

丙氨酸氨基转移酶(ALT)检测试剂盒(赖氏微板法)

(BN27220

微板法)

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:(96T)

- 试剂一:**谷丙转氨酶基质液,5mL×1瓶,4℃冰箱保存6个月;
试剂二:2,4—二硝基苯肼液,5mL×1瓶,4℃冰箱保存6个月;
试剂三:4mol/L氢氧化钠液,5mL×1瓶,室温密封保存6个月;
0.4mol/L 氢氧化钠液的配制,临用时按4mol/L氢氧化钠液:双蒸水=1:9的比例稀释,需多少配多少,室温密封保存。
试剂四:2 μ mol/mL丙酮酸钠标准液×1支,4℃冰箱保存6个月;
试剂五:0.1mol/L磷酸盐缓冲液×1支,4℃冰箱保存6个月。

三、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、**动物组织样本:**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,冰水浴条件下机械匀浆,2500转/分,离心10分钟,取上清液待测。
 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 pH7~7.4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(μ L) 37℃已预温	20	20
待测样本(μ L)	5	
37℃反应30分钟 (测定孔每吸取一个样本,将吸嘴伸入孔板底部基质液中,反复吸打混匀,但注意不要吸入气泡)		
2,4—二硝基苯肼液(μ L)	20	20
待测样本(μ L)		5
37℃反应20分钟 (对照孔每吸取一个样本,将吸嘴伸入孔板底部液体中,反复吸打混匀,但注意不要吸入气泡)		
0.4mol/L 氢氧化钠液(μ L)	200	200
轻轻水平摇动96孔板混匀,室温放置15分钟,波长510nm,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),查标准曲线,求得相应的ALT/GPT活力单位。		

四、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(以双蒸水代替血清,其他和对照孔同样操作)。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,用生理盐水稀释血清后重测。
- 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

1、操作表:

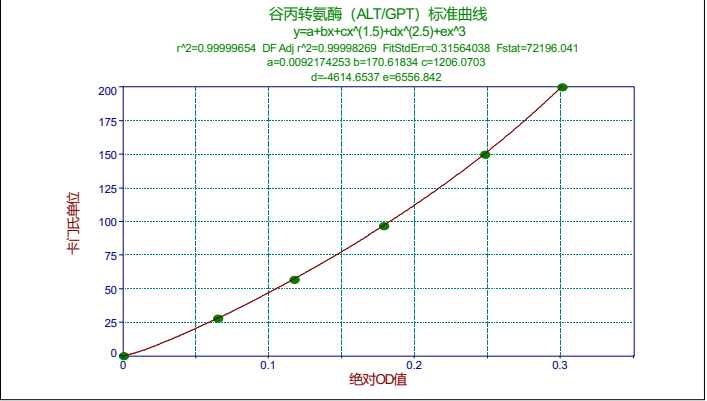
	0	1	2	3	4	5
0.1mol/L 磷酸缓冲液(μ L)	5	5	5	5	5	5
2 μ mol/mL 丙酮酸钠标准液(μ L)	0	2	4	6	8	10
基质缓冲液(μ L)	20	18	16	14	12	10
2,4—二硝基苯肼液(μ L)	20	20	20	20	20	20
37℃反应20分钟 (对照孔每吸取一个样本,将吸嘴伸入孔板底部液体中,反复吸打混匀,但注意不要吸入气泡)						
0.4mol/L 氢氧化钠液(μ L)	200	200	200	200	200	200
轻轻水平摇动96孔板混匀,室温放置15分钟,波长510nm,酶标仪测定各孔OD值,各孔吸光度减去零孔吸光度,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

【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。



附录 II：组织中 ALT 测定

1、样本前处理：

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,冰水浴条件下机械匀浆,制成 10%的组织匀浆,2500
转/分,离心 10 分钟,取上清液,再用生理盐水稀释到适宜浓度(通过标
准曲线后计算得匀浆液卡门氏单位值小于 150)待测。(取部分上清
液测蛋白浓度,蛋白定量试剂盒本所有售)

2、操作表：

	测定孔	对照孔
基质液（μL） 37℃已预温	20	20
待测样本（μL）	5	
37℃反应 30 分钟 (测定孔每吸取一个样本，将吸嘴伸入孔板底部基质液中，反 复吸打混匀,但注意不要吸入气泡)		
2，4—二硝基苯胍液（μL）	20	20
待测样本（μL）		5
37℃反应 20 分钟 (对照孔每吸取一个样本，将吸嘴伸入孔板底部液体中，反复 吸打混匀，但注意不要吸入气泡)		
0.4mol/L 氢氧化钠液（μL）	200	200
轻轻水平摇动 96 孔板混匀，室温放置 15 分钟，波长 510nm， 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)，查标准曲线，求得相应的 ALT/GPT 活力单位。		

3、计算公式：

①、计算公式：

$$\text{组织中ALT活力} = \frac{\text{通过标准曲线得}}{\text{匀浆液ALT活力(U/L)}} \div \frac{\text{待测匀浆液蛋白}}{\text{浓度(gprot/L)}}$$

附录 III：血清（浆）中 ALT 测定

1、前处理：

血清(浆)直接取样进行测定。（若酶活力超过 150 卡门氏单位
时，需用生理盐水稀释血清后重新测定）

2、操作表：

	测定孔	对照孔
基质液（μL） 37℃已预温	20	20
待测样本（μL）	5	
37℃反应 30 分钟 (测定孔每吸取一个样本，将吸嘴伸入孔板底部基质液中，反 复吸打混匀,但注意不要吸入气泡)		
2，4—二硝基苯胍液（μL）	20	20
待测样本（μL）		5
37℃反应 20 分钟 (对照孔每吸取一个样本，将吸嘴伸入孔板底部液体中，反复 吸打混匀，但注意不要吸入气泡)		
0.4mol/L 氢氧化钠液（μL）	200	200
轻轻水平摇动 96 孔板混匀，室温放置 15 分钟，波长 510nm， 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)，查标准曲线，求得相应的 ALT/GPT 活力单位。		