

谷丙转氨酶/丙氨酸氨基转氨酶(GPT/ALT)试剂盒说明书

(分光法 48 样)

一、产品简介：

丙氨酸氨基转氨酶，旧称谷丙转氨酶，缩写为 ALT 或 GPT（EC 2.6.1.2）广泛存在于动植物、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。

谷丙转氨酶/丙氨酸氨基转氨酶(GPT/ALT)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，而且与丙酮酸反应形成丙酮酸二硝基苯腙，在碱性溶液中显棕红色。通过在 520nm 读取吸光值并计算出该酶活力大小。

二、试剂盒组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存
试剂一	液体 5mL×1 支	4℃保存
试剂二	液体 6mL×1 瓶	4℃保存
试剂三	液体 6mL×1 瓶	4℃保存
试剂四	液体 60mL×1 瓶	4℃保存
标准品	粉体 mg×1 支	4℃保存

三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、水浴锅/恒温培养箱、台式离心机、可调式移液器、研钵。

四、谷丙转氨酶/丙氨酸氨基转氨酶(GPT/ALT)活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、 样本制备：

① 组织样本：

取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量(g):试剂一体积(mL)为 1:5~10 的比例提取。

② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 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）；12000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌或细胞数量(10^4 个):提取液体积(mL)为 500~1000:1 的比例提取。

③ 血清（浆）样本：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

2、 上机测定：

① 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 520nm，蒸馏水调零。

② 可先做 2 个样本预测定，熟悉操作过程，并依据测出的吸光值 A 是否超出标准曲线的线性范围来做调整。

③ 所有试剂可于 37℃孵育 5-10min，在 EP 管中依次加入：

试剂名称（ μ L）	测定管	对照管
样本	20	
试剂一	10	10

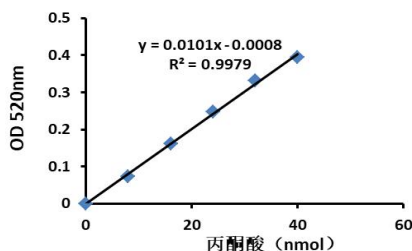
试剂二	60	60
混匀，于 37°C 孵育 30min		
试剂三	60	60
样本		20
混匀，于 37°C 孵育 10min		
试剂四	600	600
混匀，25°C 孵育 10min，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿中，于 520nm 处测定吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本做一个自身对照）。		

【注】1.若 A 测定超过 1.5，可降低样本量 V1（如 10 μ L），试剂一相应增加。则改变后的加样体积 V1 需代入计算公式重新计算。

2.若 ΔA 的值在零附近徘徊，则可增加样本量 V1（如 30 μ L，则试剂一相应减少），或增加样本取样质量（W），则改变后的加样体积 V1 和取样质量 W 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.0101x - 0.0008$ ，x 为标准品摩尔质量（nmol）；y 是 ΔA 。



2、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1 nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{GPT/ALT}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0008) \div 0.0101] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 165.02 \times (\Delta A + 0.0008) \div \text{Cpr}$$

3、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟催化产生 1nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{GPT/ALT}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0008) \div 0.0101] \div (W \times V1 \div V) \div T = 165.02 \times (\Delta A + 0.0008) \div W$$

4、按细菌或细胞密度计算：

酶活定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 1nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{GPT/ALT}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0008) \div 0.0101] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.33 \times (\Delta A + 0.0008)$$

5、血清（浆）活力计算：

酶活定义：每毫升血清（浆）每分钟催化产生 1nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{GPT/ALT}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0008) \div 0.0101] \div V1 \div T = 165.02 \times (\Delta A + 0.0008)$$

V---提取液体积，1 mL；

V1---反应体系中样本体积，0.02mL；

T---反应时间，30 min；

W---样本质量，g；

500---细胞或细菌总数，万；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（20 μ mol/mL）：加 1mL 蒸馏水溶解标准品，充分混匀。
- 2 把母液稀释成以下浓度：0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2 μ mol/mL。也可根据实际来调整浓度。
- 3 20 μ L 标准品+10 μ L 试剂一+60 μ L 试剂二+60 μ L 试剂三，混匀，于 37°C 孵育 10min；再加 600 μ L 试剂四，混匀，25°C 孵育 10min，于 520nm 处测定吸光值 A，依据结果即可制作标准曲线。