

谷丙转氨酶（ALT/GPT）测试盒说明书

（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、试剂组成与配制：（试剂盒有效期 6 个月）

试剂一：基质液，5mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：显色剂，5mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂三：浓缩终止剂，5mL×1 瓶，室温密封保存；临用时按 1：9 的比例加蒸馏水混合配成**终止剂**，需多少配多少，室温密封保存。

试剂四：丙酮酸钠标准品 1mL×1 支，4℃ 保存；

试剂五：磷酸盐缓冲液 1mL×1 支，4℃ 保存。

三、所需仪器及试剂：

酶标仪（505nm）及 96 孔板（附赠一块），37℃ 水浴锅或恒温箱，蒸馏水，蛋白测定试剂（组织或细胞样本可用，本公司有售）。

四、操作过程：

1、样本前处理：

①、**血清（浆）、细胞培养液等液体样本：**直接使用（若有固体物存在，可 4000 转/分，离心 10 分钟，取上清液用）。

②、**组织样本：**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，4000 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，蛋白定量试剂盒本公司有售）

③、**培养细胞样本前处理：**将收集好的细胞用等渗缓冲液（推荐用 0.01mol/L pH7.4 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 0.01mol/L pH7.4 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 4000 转/分，离心 10 分钟，取上清待测（上清液取部分测蛋白浓度，蛋白测定试剂盒本公司有售；或者在细胞收集后进行细胞计数，可不测蛋白）。

2、**操作步骤：**（试剂一提前 5 分钟 37℃ 预温；酶标仪提前至少 30 分钟开机预热，调整波长至 505nm 备用；终止剂可提前配好，室温密封保存）

①、**标准曲线制作：**参考附录 I。（标准曲线可与样本测定分开进行）

②、**样本测定：**（样本正式实验前最好取 1~2 例，分别进行不同倍数稀释（血清（浆）、细胞匀浆等样本推荐用原液、2 倍、5 倍、10 倍稀释，肝组织匀浆推荐用 10 倍、20 倍、40 倍、80 倍稀释）做预试，预试结果以各稀释倍数下的绝对 OD 值代入标准曲线计算后得到的卡门氏单位值在 50~100 间为最佳（正式实验时在 150 卡门氏单位以内均可，但不宜太接近上下限）；样本若是不稀

释时结果小于 50 卡门氏单位，则就用样本原液进行操作；但若是结果过低甚至出现负值，则需考虑样本酶活性过低问题，可增加样本上样量或延长第一步 37℃ 反应时间（如 60 分钟或 120 分钟等）改善）。

样本操作表如下：

	测定孔	对照孔
待测样本（μL）	5	
试剂一（μL）	20	20
轻轻震荡孔板混匀，37℃ 反应 30 分钟		
试剂二（μL）	20	20
待测样本（μL）		5
轻轻震荡孔板混匀，37℃ 反应 20 分钟		
终止剂（μL）	200	200
轻轻震荡孔板混匀，室温避光放置 15 分钟，波长 505nm，酶标仪测定各孔 OD 值（A），以绝对 OD 值（A 测定-A 对照）代入标准曲线，求得相应的 ALT/GPT 活力值（卡门氏单位）。		

注：测定孔与对照孔中加的样本为同一份样本，也就是说每个样本都要做一个测定孔和一个对照孔。

五、计算：

1、血清（浆）、细胞培养液等液体样本计算方法：

$$\text{ALT 活力 (U/L)} = \frac{\text{代入标曲计算得活力值 (卡门氏单位)}}{\text{值 (卡门氏单位)}} \times 0.482 \times N$$

2、组织（或细胞）样本按蛋白计算方法：

$$\text{ALT 活力 (U/g 蛋白)} = \frac{\text{代入标曲计算得活力值 (卡门氏单位)}}{\text{值 (卡门氏单位)}} \times 0.482 \times N \div \text{Cpr}$$

3、细胞样本按细胞数量计算方法：

$$\text{ALT 活力 (U/10^4 个细胞)} = \frac{\text{代入标曲计算得活力值 (卡门氏单位)}}{\text{值 (卡门氏单位)}} \times 0.482 \times N \div \frac{\text{细胞数}}{V_{\text{样总}}}$$

以上 3 种公式中：

0.482：卡门氏单位到 U/L 的换算（1 卡门氏单位=0.482 U/L）；

N：样本测试前的稀释倍数（组织、细胞样本不包含匀浆过程）；

Cpr：样本匀浆上清蛋白浓度，g/L；

细胞数：细胞在匀浆破碎时的总数量，10⁴ 个；

V_{样总}：细胞匀浆时加入的匀浆介质总体积，L。

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。

2、一般血清标本内源性酮酸很少，血清对照孔吸光度值会很相近。可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。

3、样本在测定完将绝对 OD 值代入标曲计算后酶活力超过 150 卡门氏单位时，需用生理盐水稀释后重测（推荐先做预试，确定稀释倍数后再进行正式实验）。

4、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。

5、试剂一提前 5-10 分钟置于 37℃ 预温。

6、标准曲线每盒试剂至少做一次。

- 7、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℃)。
- 8、试剂四丙酮酸钠标准品浓度为 2μmol/mL, 做标曲时直接使用即可。

附录 I：ALT/GPT 标准曲线制作

1、操作表:

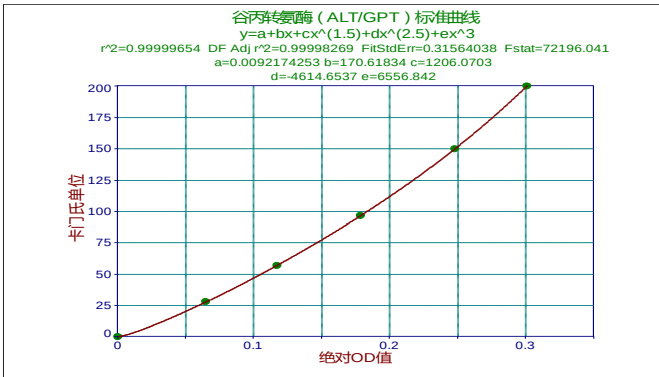
孔号	0	1	2	3	4	5
试剂五 (μL)	5	5	5	5	5	5
试剂四丙酮酸钠标准品 (μL)	0	2	4	6	8	10
试剂一 (μL)	20	18	16	14	12	10
试剂二 (μL)	20	20	20	20	20	20
轻轻震荡孔板混匀, 37℃反应 20 分钟						
终止剂 (μL)	200	200	200	200	200	200

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, 计算绝对 OD 值 (△A) =A (S) -A (S₀), 以绝对 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 酶活力卡门氏单位值。

2、测定结果(附参考标准曲线:

孔号	0	1	2	3	4	5
酶活力卡门氏单位值	0	28	57	97	150	200
各标准孔 OD 值	0.2169	0.2819	0.334	0.3957	0.4651	0.5189
绝对 OD 值	0	0.065	0.1171	0.1788	0.2482	0.301

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; 制作标准曲线时, 表格中卡门氏单位值与相应丙酮酸钠标准浓度对应, 故为定值, 直接使用即可。客户可以由此值和自己按操作表测得各标准孔的绝对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。