

谷丙转氨酶（GPT）活性测定试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 样

注 意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

GPT（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。

测定原理：

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力。

试验中所需的仪器和用品：

可见分光光度计、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

提取液：30mL×1 瓶，4℃保存。

试剂一：液体 5 mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：液体 5 mL×1 瓶，4℃保存；

试剂三：液体 50 mL×1 瓶，4℃保存；

样品测定的准备：

1、细菌、细胞或组织样品的制备：

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（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 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 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

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。8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、血清（浆）样品：直接检测。

测定操作表：

1、 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 505nm，蒸馏水调零。

2、 在 EP 管中加入下列试剂

试剂名称（ μ L）	测定管	对照管
待测样本	20	
煮沸 10min 的待测样本		20

试剂一	100	
蒸馏水		100
混匀后, 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 准确反应 20min		
试剂二	100	100
混匀后, 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 准确水浴 20min		
试剂三	1000	1000

混匀, 室温放置 10min, 在 505nm 波长处, 测各管吸光度 A。ΔA=A 测定管-A 对照管。每个测定管需设一个对照管。

计算:

1、标准条件下测定的回归曲线, $y = 0.4228x + 0.0003$ (x 为标准品浓度, umol/mL; y 为 ΔA)。

2、血清(浆) GPT 活力的计算

单位的定义: 每 mL 血清(浆) 每分钟催化产生 1nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{GPT (nmol/min/mL)} = (\Delta A - 0.0003) \div 0.4228 \div T \times 10^3 = 118.26 \times (\Delta A - 0.0003)$$

3、细胞、细菌和组织中 GPT 活力的计算

(1) 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每 mg 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。

$$\text{GPT (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A - 0.0003) \div 0.4228 \times V1] \div (V1 \times Cpr) \div T \times 10^3 = 118.26 \times (\Delta A - 0.0003) \div Cpr$$

需要另外测定, 建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每 g 组织每分钟催化产生 1nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{GPT (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A - 0.0003) \div 0.4228 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) \div T \times 10^3 = 118.26 \times (\Delta A - 0.0003) \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

单位的定义: 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。

$$\text{GPT (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A - 0.0003) \div 0.4228 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) \div T \times 10^3 = 0.236 \times (\Delta A - 0.0003)$$

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.02mL; V2: 加入提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 20min; Cpr: 蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500 万; 10^3 : 1umol/mL= 10^3 nmol/mL。

1、标准曲线线性范围为: 0.01 umol/mL -2 umol/mL。

2、ΔA 线性范围为: 0.01 -2。