

## 丙氨酸氨基转移酶(ALT)检测试剂盒(赖氏微板法)说明书

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

### 产品简介：

转氨酶是催化  $\alpha$ -氨基酸和  $\alpha$ -酮酸之间氨基转换反应的一组酶，丙氨酸氨基转移酶(ALT)旧称谷丙转氨酶(GPT)主要存在于肝细胞浆内，细胞内 ALT 浓度远高于血清，肝细胞破坏后血清 ALT 立即迅速升高，因此谷 ALT 被世界卫生组织推荐为肝功能损害最敏感的检测指标。

丙氨酸氨基转移酶(ALT)检测试剂盒(赖氏比色法)其检测原理是 ALT 催化丙氨酸与  $\alpha$ -酮戊二酸之间的氨基转移反应，其反应公式如下：

$L$ -丙氨酸 +  $\alpha$ -酮戊二酸  $\rightarrow$  丙酮酸 +  $L$ -谷氨酸。

二硝基苯胍与  $\alpha$ -酮酸反应生成相应的二硝基苯胺，在碱性条件下二硝基苯胺的吸收光谱有差异，酶标仪检测在 500~520nm 处差异最大，以等摩尔浓度计算出丙酮酸的生成量，进而计算酶的活性。100T 该检测试剂盒可检测 50 个样本(不含标准品)，该试剂盒仅用于科研领域，不宜用于临床诊断或其他用途。

### 产品组成：

名称	规格	保存温度
丙氨酸氨基转移酶(ALT)检测试剂盒	100T	4℃
试剂(A):丙酮酸标准	22mg	RT
试剂(B):丙酮酸标准稀释液	5ml	RT
试剂(C):标准对照液	2ml	4℃
试剂(D):ALT Assay Buffer	3ml	4℃避光
试剂(E):苯胍显色液	3ml	4℃避光
试剂(F):ALT 显色基液	25ml	RT
使用说明书	1 份	
有效期	6 个月	

### 自备材料：

- 1、蒸馏水
- 2、离心管
- 3、水浴锅或恒温箱
- 4、96 孔板、酶标仪

### 操作步骤(仅供参考):

#### 1、准备样品:

- ①血浆、血清样品: 血浆、血清按照常规方法制备, 可以直接用于本试剂盒的测定,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存 1 个月有效, 用于 ALT/GPT 的检测。
- ②细胞或组织样品: 取恰当细胞或组织进行匀浆, 低速离心取上清,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存 1 个月有效, 用于 ALT/GPT 的检测。
- ③(选做)样品准备完毕后可以用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度, 以便于后续计算单位蛋白重量组织或细胞内的 ALT/GPT 含量。

2、制作 ALT 标准曲线: 取丙酮酸标准 1 支, 准确加入丙酮酸标准稀释液 1ml, 充分混匀, 即配制成丙酮酸标准(100mmol/L),  $4^{\circ}\text{C}$  保存备用。临用前, 按丙酮酸标准(100mmol/L): 丙酮酸标准稀释液=1: 49 的比例混合, 即为丙酮酸标准工作液-丙酮酸标准(2mmol/L), 以 96 孔板, 按下表制备标准曲线, 最好设定平行检测孔, 求平均值。

加入物(ml)	0	1	2	3	4
丙酮酸标准(2mmol/L)	0	2	4	6	8
标准对照液	4	4	4	4	4
ALTAssayBuffer( $37^{\circ}\text{C}$ 提前孵育 5min)	20	18	16	14	12
相当于 ALT/GPT(卡门单位)	0	28	57	97	150

混匀, 向各管中加入苯肼显色液 20ul, 混匀,  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 20min, 加入 ALT 显色基液 200ul, 混匀。室温放置 5min, 以蒸馏水调零, 酶标仪 505nm 处读取各管吸光度。各管吸光度均减去"0"号管吸光度, 所得吸光度差值(纵坐标)与对应的卡门酶活力单位(横坐标)作图。注意: 标准品用分光光度计检测参考值在 0.3~0.9 之间, 加入 ALT 显色基液后其颜色依次为黄色至棕红色, 应及时检测, 随着时间的延长其颜色会加深, 由于检测仪器、操作手法等条件的不同, 参考值范围会有波动。

3、ALT 加样: 按照下表设置对照孔、测定孔, 溶液应按照顺序依次加入, 并注意避免产生气泡。如果样品中的 ALT 酶活性过高, 可以减少样品用量或适当稀释后再进行测定。

加入物(ml)	对照孔	测定孔
待测样品(如血清等)	4	4
ALTAssayBuffer( $37^{\circ}\text{C}$ 提前孵育 5min)	-	20
混匀, $37^{\circ}\text{C}$ 孵育 30min。		
ALTAssayBuffer( $37^{\circ}\text{C}$ 提前孵育 5min)	20	-
苯肼显色液	20	20
混匀, $37^{\circ}\text{C}$ 孵育 20min。		
ALT 显色基液	200	200

4、ALT 测定：混匀，室温放置 5min，以蒸馏水调零，酶标仪 505nm 处测定对照管、测定管的吸光度(即为 A 对照、A 测定)，如无 505nm 可选择 500~520nm。

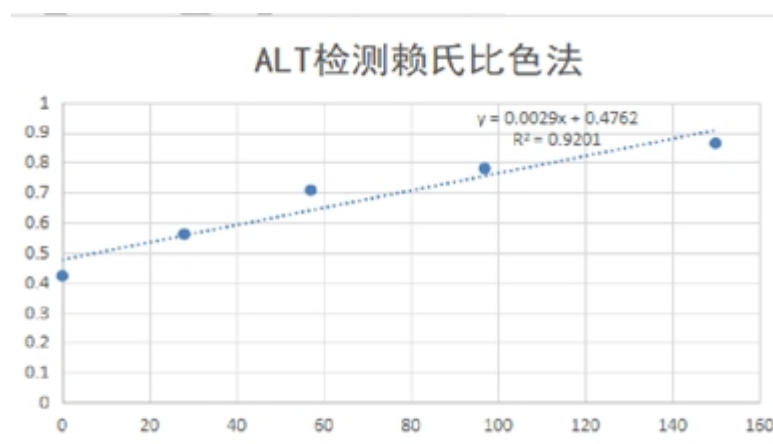
**计算：**以系列标准孔活力卡门单位为横坐标，以对应的吸光度为纵坐标，绘制标准曲线，以 (A 测定 - A 对照) 之差值，从标准曲线查得 ALT 活力卡门单位

**参考范围：**成年健康人血清 ALT：5~25 卡门单位/ml

**注意事项：**

- 1、苯肼显色液溶解以后，如果仍然有结晶析出，应过滤后使用或弃用。
- 2、由于赖氏法的特点，在绘制标准曲线时每个点最好做 3 管的重复测定，求出各标准管的吸光度均值，减去“0”号管吸光度均值，对照赖氏单位绘制标准曲线。
- 3、血清中 ALT 活性在室温可以保存 2 天，4℃保存 1 周，-20℃保存 1 个月。
- 4、成批样本测定时一般无需每份样本都做自身血清对照，以试剂空白管代替即可。
- 5、对于超过正常范围的血清样本，应该进行复测，复测时每份样本都应做自身血清对照。
- 6、严重黄疸、脂血或溶血的血清，可能会引起测定管吸光度增高，因此检测该类样本时应做自身血清标本对照。
- 7、当样本的酶活力大于 150 卡门单位时，应将样本进行 5~10 倍稀释后再行测定。

**附录：**参考标准曲线范围：测定丙酮酸标准在 2mmol/L 时，通过分光光度计测定其吸光度多在 0.3~0.9 之间，加入 ALT 显色基液后其颜色依次为黄色至棕红色，应及时检测，随着时间的延长其颜色会加深。测定丙酮酸标准在 0、28、57、97、150 卡门单位时吸光度，据此作出其标准曲线如下：



**注意：**由于检测仪器和操作手法等条件的不同，参考值范围会有波动，该值仅供参考，对于要求精确计算 ALT 含量的，可以采用标准曲线进行多点重复测定；根据测定经验显示标准品浓度在 0.6mmol/L 以下，1.8mmol/L 以上，标准曲线会有偏差。