

谷丙转氨酶(GPT)活性测定试剂盒说明书

Glutamic-pyruvic Transaminase Assay Kit

微量法

货号: AK085

规格: 100T/48S

产品清单及储存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES08	60mL×1 瓶	4℃保存
AK085-A	粉剂×1 瓶	4℃保存; 临用前加入少量提取液溶解, 并调 PH 值为 7.4, 然后用提取液定容至 2.5ml, 现用现配
AK085-B	3 mL×1 瓶	4℃保存
AK085-C	30 mL×1 瓶	4℃保存
AK085-标准品 (20 μ mol/ml)	1 mL×1 支	4℃保存

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

产品简介:

意义: 谷丙转氨酶 (Glutamic-pyruvic Transaminase, 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。

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。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

样品制备:

1. 细菌、细胞样品的制备:

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 (10⁴ 个): 提取液 ES08 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 ES08), 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。

2. 组织样品的制备:

组织: 按照组织质量 (g): 提取液 ES08 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 ES08), 进行冰浴匀浆。8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

3. 血清 (浆) 样品: 直接检测

检测步骤:

- 分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 505nm, 蒸馏水调零。
- 标准曲线的稀释: 将标准品用蒸馏水稀释至 1 μ mol/mL、0.8 μ mol/mL、0.4 μ mol/mL、0.2 μ mol/mL、0.1 μ mol/mL、0.05 μ mol/mL、0 μ mol/mL。
- 在 96 孔板中按下表加入试剂:

试剂名称(ul)	测定管	对照管	标准管
----------	-----	-----	-----

待测样本	5		
AK085-A	25	25	
标准液			30
混匀后, 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 预热 30min			
AK085-B	25	25	25
待测样本		5	
混匀后, 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 准确水浴 20min			
AK085-C	240	240	240
混匀, 室温放置 10min, 在 505nm 波长处, 测各管吸光度。 每个测定管需设一个对照管。			

计算公式:

1. 标准曲线的绘制:

以各标准溶液浓度为 x 轴, 以 A505 为 y 轴做标准曲线, 得到方程 $y=kx+b$; 将 (A 测定管-A 对照管) 带入方程求 x 值。

2. GPT活性计算:

(1) 按样本质量计算:

单位定义: 每小时每 g 样本催化产生 1 μmol 丙酮酸的量为一个 GPT 活力单位。

$$\text{GPT (U/g 质量)} = x \times (V_{\text{样本}} + \text{AK085-A}) \div (W \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 12x \div W$$

(2) 按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每小时每 mg 组织蛋白催化产生 1 μmol 丙酮酸的量为一个 GPT 活力单位。

$$\text{GPT (U/mg prot)} = x \times (V_{\text{样本}} + \text{AK085-A}) \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样本}}) \div T = 12x \div C_{\text{pr}}$$

(3) 按血清 (浆) 体积计算:

单位定义: 每小时每 mL 血清 (浆) 样本催化产生 1 μmol 丙酮酸的量为一个 GPT 活力单位。

$$\text{GPT (U/mL)} = x \times (V_{\text{样本}} + \text{AK085-A}) \div V_{\text{样本}} \div T = 12x$$

(4) 按细胞或细菌数量计算:

单位定义: 每小时每 10⁴ 个细胞或细菌催化产生 1 μmol 丙酮酸的量为一个 GPT 活力单位。

$$\text{GPT (U/10}^4 \text{ cell)} = x \times (V_{\text{样本}} + \text{AK085-A}) \div (500 \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.024x$$

V 样本: 0.005mL; AK085-A: 0.025mL; V 样总: 提取液体积, 1mL; W: 样本质量, g; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; T: 反应时间, 0.5h; 500: 细胞或细菌总数, 500 万。