

谷丙转氨酶（GPT）活性测定试剂盒说明书

微量法 100管/48样

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/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制

提取液：60mL×1瓶，4℃保存。

试剂一：液体2.5 mL×1瓶，4℃保存；

试剂二：液体2.5 mL×1瓶，4℃保存；

试剂三：液体25 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（10⁴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。

测定步骤

1. 分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至505nm，蒸馏水调零。
2. 在EP管或在96孔板中加入下列试剂

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

试剂一	25	
蒸馏水		25

混匀后，37°C（哺乳动物）或25°C（其它物种）准确反应20min

试剂二	25	25
-----	----	----

混匀后，37°C（哺乳动物）或25°C（其它物种）准确反应20min

试剂三	240	240
-----	-----	-----

混匀，室温（25°C）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

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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。

$$\text{GPT (nmol/min/mL)} = (\Delta A - 0.0003) \div 0.4228 \div T \times 103 = 118.26 \times (\Delta A - 0.0003)$$

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。

$$\text{GPT (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A - 0.0003) \div 0.4228 \times V1] \div (V1 \times Cpr) \div T \times 103 = 118.26 \times (\Delta A - 0.0003) \div Cpr$$

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。

$$\text{GPT (nmol/min/g鲜重)} = [(\Delta A - 0.0003) \div 0.4228 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) \div T \times 103 = 118.26 \times (\Delta A - 0.0003) \div W$$

(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。

$$\text{GPT (nmol/min/104 cell)} = [(\Delta A - 0.0003) \div 0.4228 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) \div T \times 103 = 0.236 \times (\Delta A - 0.0003)$$

V1：加入反应体系中样本体积，0.01mL；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；103：1umol/mL=103 nmol/mL。

b.使用96孔板测定的计算公式如下：

1、标准条件下测定的回归曲线， $y = 0.2114x + 0.0003$ （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。

$$\text{GPT (nmol/min/mL)} = (\Delta A - 0.0003) \div 0.2114 \div T \times 103 = 236.5 \times (\Delta A - 0.0003)$$

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。

$$\text{GPT (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A - 0.0003) \div 0.2114 \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \times 103 = 236.5 \times (\Delta A - 0.0003) \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{GPT (nmol/min/g鲜重)} = [(\Delta A - 0.0003) \div 0.2114 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) \div T \times 103 = 236.5 \times (\Delta A - 0.0003) \div W$$

(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。

$$\text{GPT (nmol/min/104 cell)} = [(\Delta A - 0.0003) \div 0.2114 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) \div T \times 103 = 0.473 \times (\Delta A - 0.0003)$$

V1：加入反应体系中样本体积，0.01mL；V2：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，20 min；Cpr：蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细胞或细菌总数，500万；103：1umol/mL=103 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 -1。