

## 谷丙转氨酶（GPT）活性测定试剂盒说明书

微量法 100 管/48 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  $\alpha$ -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（ $10^4$  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（ $\mu$ 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℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）准确反应 20min |     |     |
| 试剂二                                | 25  | 25  |
| 混匀后，37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）准确反应 20min |     |     |
| 试剂三                                | 240 | 240 |

混匀，室温（25℃）放置 10min，在 505nm 波长处测各管吸光度 A。 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。每个测定管需设一个对照管。

## 计算

### a. 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， $\mu\text{mol/mL}$ ；y 为  $\Delta A$ ）。

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，0.01mL；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； $10^3$ ： $1\mu\text{mol/mL} = 10^3 \text{ nmol/mL}$ 。

### 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， $\mu\text{mol/mL}$ ；y 为  $\Delta A$ ）。

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。

$$\text{GPT (nmol/min/mL)} = (\Delta A - 0.0003) \div 0.2114 \div T \times 10^3 = 236.5 \times (\Delta A - 0.0003)$$

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。

$$\text{GPT (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A - 0.0003) \div 0.2114 \times V1] \div (V1 \times Cpr) \div T \times 10^3 = 236.5 \times (\Delta A - 0.0003) \div Cpr$$

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。

$$\text{GPT (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A - 0.0003) \div 0.2114 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) \div T \times 10^3 = 236.5 \times (\Delta A - 0.0003) \div W$$

（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。

$$\text{GPT (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A - 0.0003) \div 0.2114 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) \div T \times 10^3 = 0.473 \times (\Delta A - 0.0003)$$

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;  $10^3$ : 1umol/mL= $10^3$  nmol/mL。

1、 标准曲线线性范围为: 0.01 umol/mL -2 umol/mL。

2、  $\Delta A$  线性范围为: 0.01 -1。