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（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（μL）	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。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。

GPT（nmol/min/mL）=（ΔA-0.0003）÷0.4228÷T×10^3=118.26×（ΔA-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。

GPT（nmol/min/mg prot）=[（ΔA-0.0003）÷0.4228×V1]÷(V1×Cpr)÷T×10^3 =118.26×（ΔA-0.0003）÷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。

GPT（nmol/min/g 鲜重）=[（ΔA-0.0003）÷0.4228×V1]÷(W×V1÷V2)÷T×10^3 =118.26×（ΔA-0.0003）÷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。

GPT（nmol/min/10^4 cell）=[（ΔA-0.0003）÷0.4228×V1]÷(500×V1÷V2)÷T×10^3 =0.236×（ΔA-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；10^3：1umol/mL=10^3 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。

GPT（nmol/min/mL）=（ΔA-0.0003）÷0.2114÷T×10^3=236.5×（ΔA-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。

GPT（nmol/min/mg prot）=[（ΔA-0.0003）÷0.2114×V1]÷(V1×Cpr)÷T×10^3 =236.5×（ΔA-0.0003）÷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。

GPT（nmol/min/g 鲜重）=[（ΔA-0.0003）÷0.2114×V1]÷(W×V1÷V2)÷T×10^3 =236.5×（ΔA-0.0003）÷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。

GPT（nmol/min/10^4 cell）=[（ΔA-0.0003）÷0.2114×V1]÷(500×V1÷V2)÷T×10^3 =0.473×（ΔA-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、 ΔA 线性范围为：0.01 -1。