（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

产品货号：E-BC-K235-M

产品规格：48T(18 samples)/96T(42 samples)

检测仪器：酶标仪(500-520 nm)

Elabscience®谷丙转氨酶(ALT/GPT)比色法测试盒

Alanine Aminotransferase (ALT/GPT) Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

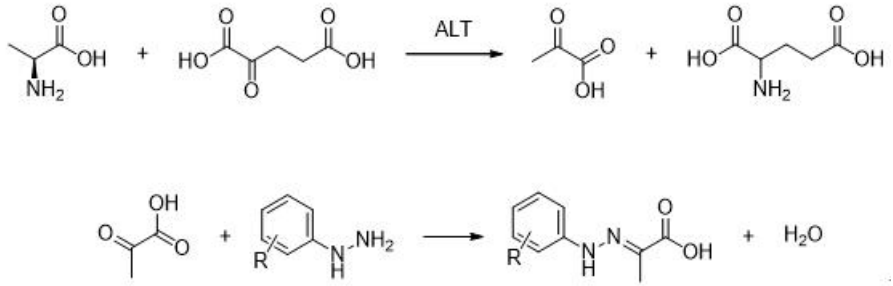
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清（浆）、动物组织、细胞和细胞上清中的 ALT 活力。

检测原理

在 37℃、pH7.4 条件下，谷丙转氨酶（ALT）催化丙氨酸与α-酮戊二酸之间的氨基转换反应，生成丙酮酸和谷氨酸，反应时间过后，加入苯肼，与丙酮酸生成苯腙，苯腙在碱性条件下呈红棕色。



本试剂盒检测组织或细胞时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	0.5 mL×1 支	0.5 mL×1 支	2-8℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	2 mmol/L 丙酮酸钠溶液 (2 mmol/L Sodium Pyruvate)	0.5 mL×1 支	0.5 mL×1 支	2-8℃ 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	底物基质溶液 (Substrate Solution)	2.5 mL×1 瓶	5 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	显色剂 (Chromogenic Agent)	2.5 mL×1 瓶	5 mL×1 瓶	2-8℃避光 保存 6 个月

试剂五 (Reagent 5)	碱溶液 (Alkali Reagent)	2.5 mL×1 瓶	5 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
	96 孔酶标板	48 孔×1 块	96 孔×1 块	无要求
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪（500-520 nm），恒温箱(37°C)

试剂：双蒸水、生理盐水（0.9% NaCl）、PBS（0.01 M，pH 7.4）。

试剂准备

① 检测前，试剂平衡至室温。

② 试剂五工作液：

将试剂五：双蒸水按照1: 9的体积比稀释，现用现配。

③ 取部分试剂三，在37℃恒温箱中预温10 min。

样本准备

① 样本处理

血清(浆)等液体样本：直接测定。

组织样本：组织样本使用生理盐水(0.9% NaCl)匀浆处理。离心后取上清进行测定，部分上清样本用于蛋白浓度测定。

细胞样本：细胞样本使用生理盐水(0.9% NaCl)进行机械匀浆或超声破碎。匀浆离心后取上清进行测定，部分上清样本用于蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.75-72.30 IU/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
人血清	不稀释	10%大鼠脑匀浆	不稀释
人血浆	不稀释	10%大鼠心匀浆	不稀释
猪血清	不稀释	10%大鼠肝匀浆	40-60
大鼠血清	不稀释	10%大鼠肾匀浆	不稀释

注：样本稀释液为生理盐水(0.9% NaCl)或 PBS（0.01 M，pH 7.4）。

实验关键点

① 加样或者试剂时，板孔壁上不能挂液。

② 加入试剂五工作液，加入速度要一致（使用多道移液器）。

③ 样本须新鲜（血清样本 2-8℃保存 7 天，-25℃保存 20 天）。

操作步骤

① 标准孔：在设置好的标准孔中，分别加入 5 μL 试剂一（触板底加入）（所有的操作中，板孔壁上不能挂液）。

② 向标准孔中从 A 孔到 F 孔分别加入 20、18、16、14、12、10 μL 的试剂三。

③ 向标准孔中从 A 孔到 F 孔分别加入 0、2、4、6、8、10 μL 的试剂二，且每次吸取试剂二后，都需要将吸嘴伸入板孔液体中吸打混匀。

④ 样本孔：在样本对照孔、样本测定孔中加入 20 μL 试剂三（已预温 10 min）。

⑤ 在样本测定孔中加入 5 μL 样本，并将吸嘴伸入孔底部液体中吸打混匀。将酶标板置于 37℃中孵育 30 min。

⑥ 向标准孔、样本对照孔、样本测定孔中加入 20 μL 试剂四。

⑦ 向样本对照孔中加入 5 μL 样本，并将吸嘴伸入板孔液体中吸打混匀。

⑧ 在酶标仪上振荡混匀 10 s，37℃孵育 20 min。

⑨ 向各孔中加入 200 μL 试剂五工作液（使用多道移液器，加入速度须一致）。

⑩ 在酶标仪上振荡混匀 10 s，室温静置 15 min，酶标仪 510 nm 测各孔 OD 值。

操作表

标准曲线

	A	B	C	D	E	F
试剂一(μL)	5	5	5	5	5	5
试剂三(μL)	20	18	16	14	12	10
试剂二(μL)	0	2	4	6	8	10
每加一次试剂二，都需将吸嘴伸入板孔液体中吸打混匀，加完后 37℃孵育 30 min。						
试剂四(μL)	20	20	20	20	20	20
酶标仪上震荡混匀 10 s，37℃孵育 20 min						
试剂五工作液(μL)	200	200	200	200	200	200
在酶标仪上振荡混匀 10 s，室温静置 15 min，酶标仪 510 nm 测各孔 OD 值。以标准孔绝对 OD 值为横坐标，0、28、57、97、150、200 卡门氏单位为纵坐标，绘制二次函数曲线。						

样本测定

	对照孔	测定孔
37 ℃预温 10 min 的试剂三(μL)	20	20
待测样本(μL)	--	5
测定孔加入一个样本，都需将吸嘴伸入板孔液体中吸打混匀，加完后 37℃孵育 30 min。		
试剂四(μL)	20	20
待测样本(μL)	5	--
对照孔每加入一个样本，都需将吸嘴伸入板孔液体中吸打混匀，加完后，酶标仪上震荡混匀 10 s，37℃孵育 20 min。		
试剂五工作液(μL)	200	200
在酶标仪上震荡混匀 10 s，室温静置 15 min，酶标仪 510 nm 测各孔 OD 值。将样本绝对 OD 值（样本测定 OD-样本对照 OD 值）带入曲线公式中计算。		

本试剂盒检测组织或细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

结果计算

标准品拟合曲线： $y = a x^2 + b x + c$

卡门氏单位定义：

25℃，1 mL 液体，反应液总量 3 mL，波长 340 nm，1 cm 光径，1 min 内所生成的丙酮酸，使 NADH 氧化成 NAD^+而引起吸光度下降 0.001 为一个单位。（1 卡门氏单位=0.482 IU/L，25℃）

国际单位定义：

25℃条件下，每分钟催化 1 μmol NADH 减少量所需的酶量为一个单位。

血清(浆)、细胞上清中 ALT 浓度计算公式：

ALT 含量（IU/L）$=[a \times (\Delta A_{510})^2 + b \times \Delta A_{510} + c] \times 0.482$ IU/L* × f

细胞、组织中 ALT 浓度计算公式：

ALT 含量（IU/gprot）$=[a \times (\Delta A_{510})^2 + b \times \Delta A_{510} + c] \times 0.482$ IU/L* × f ÷ C_{pr}

注解:

y：卡门氏单位（0、28、57、97、150、200）

x：标准品 OD 值-空白 OD 值（卡门式单位为 0 时的 OD 值

a,b,c：拟合曲线相应的常数

ΔA_{510}：样本的绝对 OD 值（样本测定 OD 值-样本对照 OD 值）

*：25℃条件下，一卡门氏单位=0.482 IU/L

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

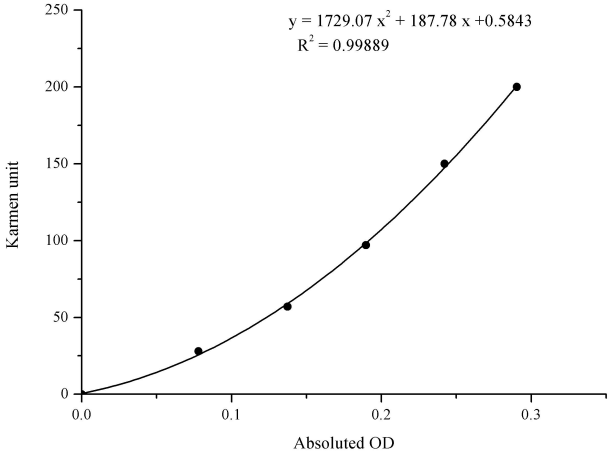
C_{pr}：组织样本蛋白浓度：gprot/L

附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	0.75-72.30 IU/L	**平均批间差**	9.0 %
灵敏度	0.75 IU/L	**平均批内差**	5.3 %

2. 标准曲线(数据仅供参考)



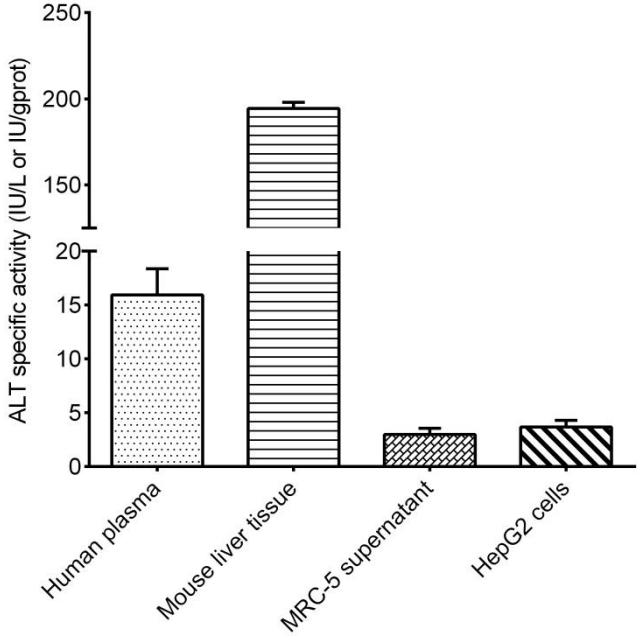
附录2 实例分析

例如检测兔血清(数据仅供参考)：

取5 μL兔血清，按操作表操作，结果如下：标准曲线：$y = 1729.07\ x^2 + 187.78\ x + 0.5843$，对照管平均OD值为0.254，测定管平均OD值为0.303，计算结果为：

ALT 含量（IU/L）$=[1729.07\times(0.303 - 0.254)^2 + 187.78\times(0.303 - 0.254) + 0.5843]\times 0.482 = 6.72$ IU/L

按照操作过程，测定人血浆（加样量5 μL）、小鼠肝脏组织（10%组织匀浆的蛋白含量11.50 g/L，稀释50倍，加样量5 μL）、MRC-5细胞上清（加样量5 μL）和HepG2细胞（蛋白含量3.39 g/L，加样量5 μL）中ALT活力（如下图）：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
测值不稳定，复孔差异大	板孔中存在气泡	用枪头轻轻戳破气泡
	试剂五工作液加入速度不一样	使用多道移液器加入
样本和标准品显色很低	孵育时间太短	保证充足的孵育时间
样本测不出值	样本稀释倍数太大	选择合适稀释倍数，重新检测
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本，重新检测
样本测量结果>72.30 IU/L	样本浓度太高	选择合适稀释倍数，重新检测

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

附录4 客户发表文献

1. Fang X, Ding H, Chen Y, et al. Wireless Optogenetic Targeting Nociceptors Helps Host Cells Win the Competitive Colonization in Implant-Associated Infections[J]. Small Methods, 2024, 8(12): 2400216.

2. Lyu Y, Yang X, Yang L, et al. Lipid nanoparticle-mediated hepatocyte delivery of siRNA and silibinin in metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease[J]. Journal of Controlled Release, 2024, 373: 385-398.

3. Li C, Wu Y, Chen K, et al. Gp78 deficiency in hepatocytes alleviates hepatic ischemia-reperfusion injury via suppressing ACSL4-mediated ferroptosis[J]. Cell Death & Disease, 2023, 14(12): 810.

4. Liu D, Zhan J, Wang S, et al. Chrysanthemum morifolium attenuates metabolic and alcohol-associated liver disease via gut microbiota and PPARα/γ activation[J]. Phytomedicine, 2024, 130: 155774.

5. Ma Y, Zhou W, Wang H, et al. The double-layer emulsions loaded with bitter melon (Momordica charantia L.) seed oil protect against dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 278: 134279.

6. Wang Y, Wang J, Zhou T, et al. Investigating the potential mechanism and therapeutic effects of SLXG for cholesterol gallstone treatment[J]. Phytomedicine, 2024, 132: 155886.