

(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。

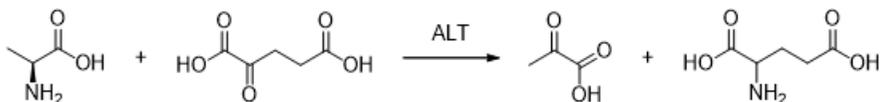
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

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°C、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，加入苯胍，与丙酮酸生成苯胍，苯胍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°C 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°C 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°C 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°C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	1 板		
	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℃)

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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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°C 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°C 孵育 20 min						
试剂五工作液(μL)	200	200	200	200	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。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°C 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°C 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°C 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: $y = ax^2 + bx + c$

卡门氏单位定义:

25°C, 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°C)

国际单位定义:

25°C 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:

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

细胞、组织中 ALT 浓度计算公式:

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

注解:

y: 卡门氏单位 (0、28、57、97、150、200)

x: 标准品 OD 值-空白 OD 值 (卡门氏单位为 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°C 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

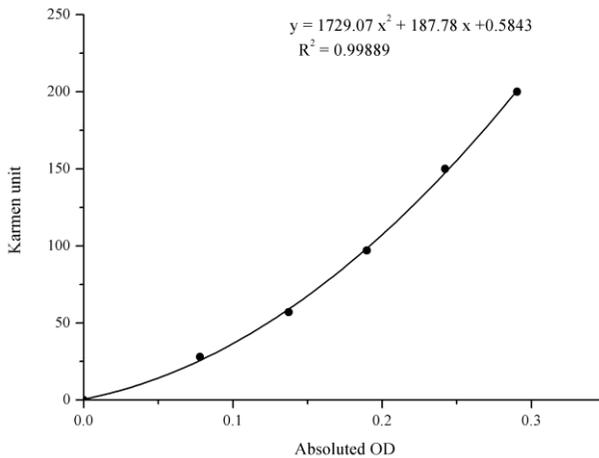
C_{pr} : 组织样本蛋白浓度: gprot/L

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)



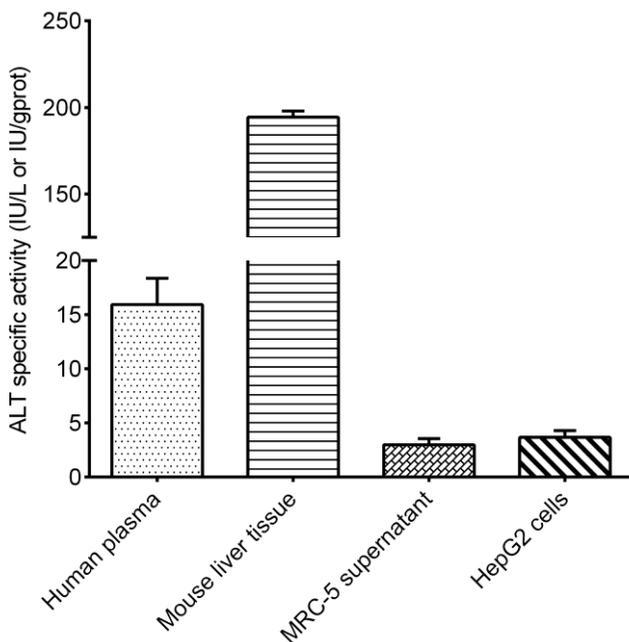
附录2 实例分析

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:

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

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于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. Zhang X, He C, Chen Y, et al. Cyclic reactions-mediated self-supply of H₂O₂ and O₂ for cooperative chemodynamic/starvation cancer therapy[J]. *Biomaterials*, 2021, 275:120987-. IF:12.479
2. Xia H, Scholtes C, Dufour CR, et al. Insulin action and resistance are dependent on a GSK3 β -FBXW7-ERR α transcriptional axis. *Nat Commun.* 2022; 13 (1):2105. IF:14.919
3. Liu Q, Zhang T X, Zheng Y D, et al. Calixarene-Embedded Nanoparticles for Interference-Free Gene-Drug Combination Cancer Therapy[J]. *Small*, 2021, 2006223. IF:11.459
4. He C, Zhang X, Chen C, et al. A solid lipid coated calcium peroxide nanocarrier enables combined cancer chemo/chemodynamic therapy with O₂/H₂O₂ self-sufficiency[J]. *Acta Biomaterialia*, 2021, 122. IF:8.203
5. Chen L, Tao F, Zhang Y, et al. Islet-cell autoantigen 69 accelerates liver regeneration by downregulating Tgfb1 and attenuating Tgf β signaling in mice[J]. *FEBS Letters*, 2020, 594(17). IF:6.665
6. Omar N, Frank J, Kruger J, et al. Effects of High Intakes of Fructose and Galactose, with or Without Added Fructooligosaccharides, on Metabolic Factors, Inflammation, and Gut Integrity in a Rat Model [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2021:2001133. IF:5.914
7. Wang C, Ma C, Fu K, et al. Phillygenin Attenuates Carbon Tetrachloride-Induced Liver Fibrosis via Modulating Inflammation and Gut Microbiota[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 9, 21. IF:5.81
8. Du Y Q, Zheng Y Z, Yu C X M, et al. The Mechanisms of Yu Ping Feng San in Tracking the Cisplatin-Resistance by Regulating ATP-Binding Cassette Transporter and Glutathione S-Transferase in Lung Cancer Cells[J].*Frontiers in Pharmacology*, 2021; 12: 678126. IF:5.81
9. Zeng X Peng, Wang L J, Guo L H, et al. Dasatinib ameliorates chronic pancreatitis induced by caerulein via anti- fibrotic and anti-inflammatory mechanism[J]. *Pharmacological Research*, 2019, 147, 104357. IF:5.574
10. Cao X, Liang Y, Liu R, et al. Uncovering the Pharmacological Mechanisms of Gexia-Zhuyu Formula (GXZY) in Treating Liver Cirrhosis by an Integrative Pharmacology Strategy. *Front Pharmacol.* 2022; 13:793888. IF:5.331
11. Wang Y, Xie W, Feng Y, et al. Epithelial-derived exosomes promote M2 macrophage polarization via Notch2/SOCS1 during mechanical ventilation. *Int J Mol Med.* 2022; 50 (1). IF:5.314

12. Jung D S, Son Y J, Shin J M, et al. Gymnaster Koraiensis Extract Alleviated Metabolic Syndrome Symptoms and Stimulated UCP1-Independent Energy Consumption via AMPK Activation in White Adipose Tissue[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2020. IF:5.309
13. Ali A K, Komal A K, Almutairi S M, et al. Natural killer cell-derived IL-10 prevents liver damage during sustained murine cytomegalovirus infection[J]. *Frontiers in immunology*, 2019, 10: 2688. IF:5.085
14. Xu Y , Zhang Y , Xu Y , et al. Activation of CD137 signaling promotes macrophage apoptosis dependent on p38 MAPK pathway-mediated mitochondrial fission[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2021 Jul;136:106003. IF:5.085
15. Naseh A, Shirin B, Maryam M, et al. Attenuation of chronic arsenic neurotoxicity via melatonin in male offspring of maternal rats exposed to arsenic during conception: Involvement of oxidative DNA damage and inflammatory signaling cascades[J]. *Life Sciences* 266 (2021) 118876. IF:5.037
16. Ahmed A E, Alshehri A, Al-Kahtani M A, et al. Vitamin E and selenium administration synergistically mitigates ivermectin and doramectin-induced testicular dysfunction in male Wistar albino rats[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 124: 109841. IF:4.545
17. Su S, Tian H, Jia X, et al. Mechanistic insights into the effects of SREBP1c on hepatic stellate cell and liver fibrosis[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020. IF:4.486
18. Wang L J, He L, Hao L, et al. Isoliquiritigenin ameliorates caerulein-induced chronic pancreatitis by inhibiting the activation of PSCs and pancreatic infiltration of macrophages[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020. IF:4.486
19. Dejan Lazić, Andreas Scheurer, Dušan Ćocić, et al. New bis-pyrazolylpyridine ruthenium(III) complex as a potential anticancer drug: In vitro and in vivo activity in murine colon cancer[J]. *Dalton Transactions*, 2021 Jun; 50(22):7686-7704. IF:4.39
20. Li X, Lv Z, Chen J, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* B10 can alleviate liver apoptosis and oxidative stress induced by aflatoxin B1[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2021, 151:112124. IF:4.06