

谷丙转氨酶活力测定（改良赖氏法）

实验目的

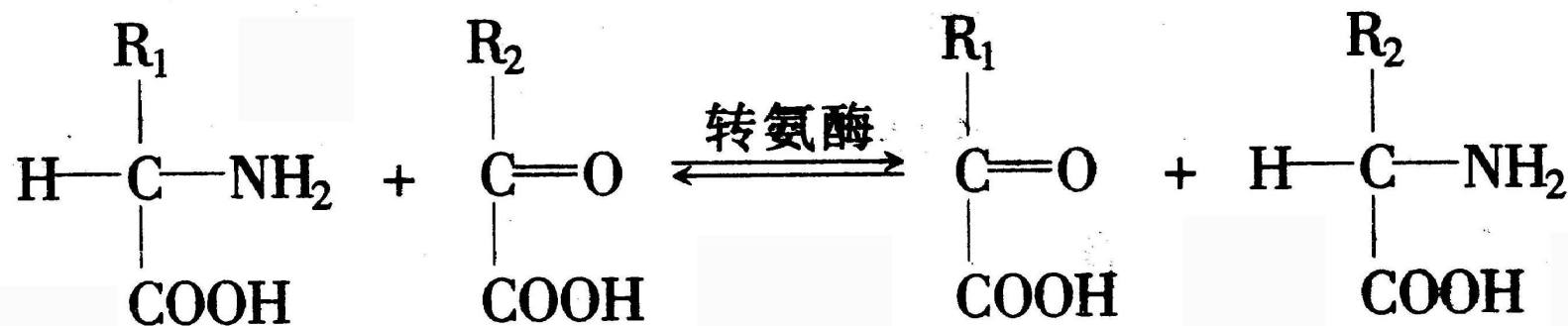
- 掌握血清丙氨酸氨基转移酶（ALT，也称谷丙转氨酶，GPT）活性测定的原理；
- 熟悉转氨酶活性测定的操作方法；
- 了解测定血清丙氨酸氨基转移酶活性的临床意义。

相关理论

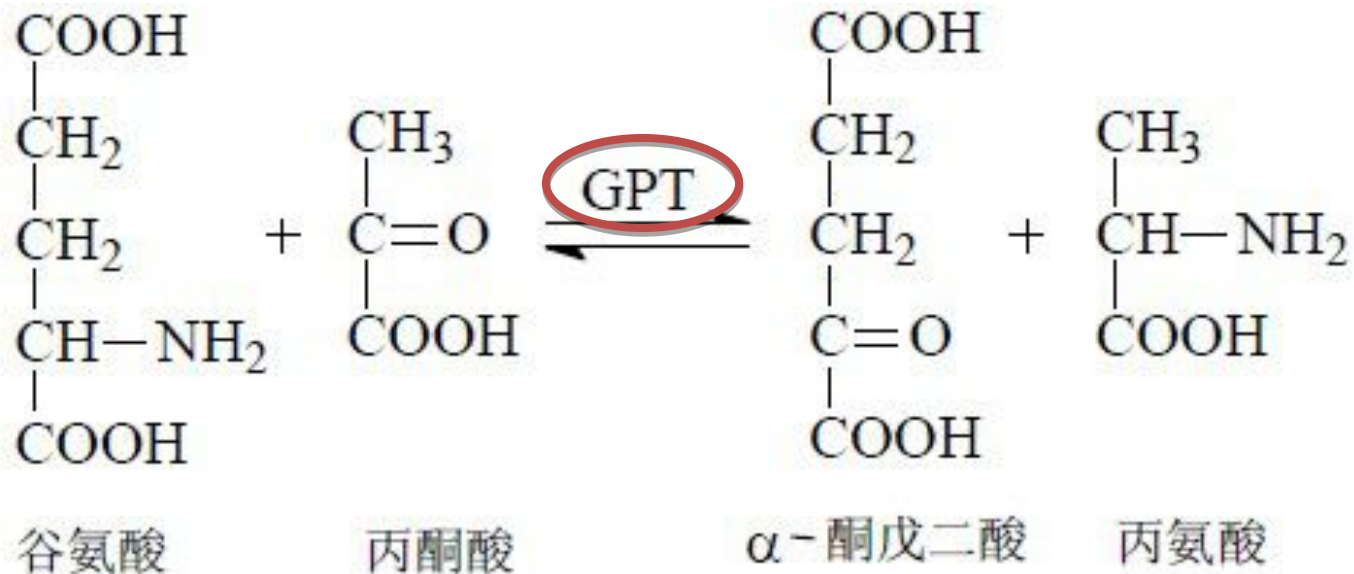
- 体内蛋白质处于不断降解与合成的动态平衡；
- 食物蛋白质经消化吸收的氨基酸和体内组织蛋白质降解产生的氨基酸混在一起，分布于体内各处，作为参与代谢的氨基酸库；
- 氨基酸分解代谢的主要反应是脱氨基作用；
- 肝脏的脱氨基方式有：氧化脱氨基，**氨基转换作用**及联合脱氨基。

氨基转移酶（转氨酶）

：催化氨基酸与酮酸之间氨基转移的一类酶



- 谷丙转氨酶 glutamic-pyruvic transminase **GPT**
又称丙氨酸转氨酶 alanine aminotransferase **ALT**



- 谷草转氨酶 glutamic oxaloacetic transaminase **GOT**
 又称天冬氨酸转氨酶 aspartate transaminase, **AST**



临床意义

- GPT在肝细胞内活性最高，比血清高100倍，当有1%的肝细胞坏死时，可使血清内酶活性升高1倍。
- GPT是肝细胞受损最敏感的指标之一
- 肝炎：病毒性肝炎的潜伏期、急性发病期，以及隐性感染者均可有血清谷丙转氨酶升高，且往往是GPT单项升高
- 如果GPT血清值超过正常上限2—3倍，并持续两周以上，表明有肝胆疾病存在的可能。
- 参考范围：0-50 U/L，卡门氏单位0-25 KarU。

临床意义

- GPT在肝细胞内活性最高，比血清高100倍，当有1%的肝细胞坏死时，可使血清内酶活性升高1倍。
- GPT是肝细胞受损最敏感的指标之一
- 人血清GPT的正常值为0-25卡门氏单位

转氨酶作用的意义

- 正常时转氨酶主要分布在细胞内，血清中酶活力很低

	正常组织		异常组织	
	心脏	肝脏	心脏	肝脏
细胞中酶活力	GOT高 高	GOT/GPT	细胞破损酶溢出	
血清中酶活力	GOT低 低	GOT/GPT	GOT/GPT升高	GOT升高

- GOT以心脏细胞中活力最大，其次为肝脏细胞
- GPT则以肝脏细胞中活力最大

酶活力单位 (U , active unit)

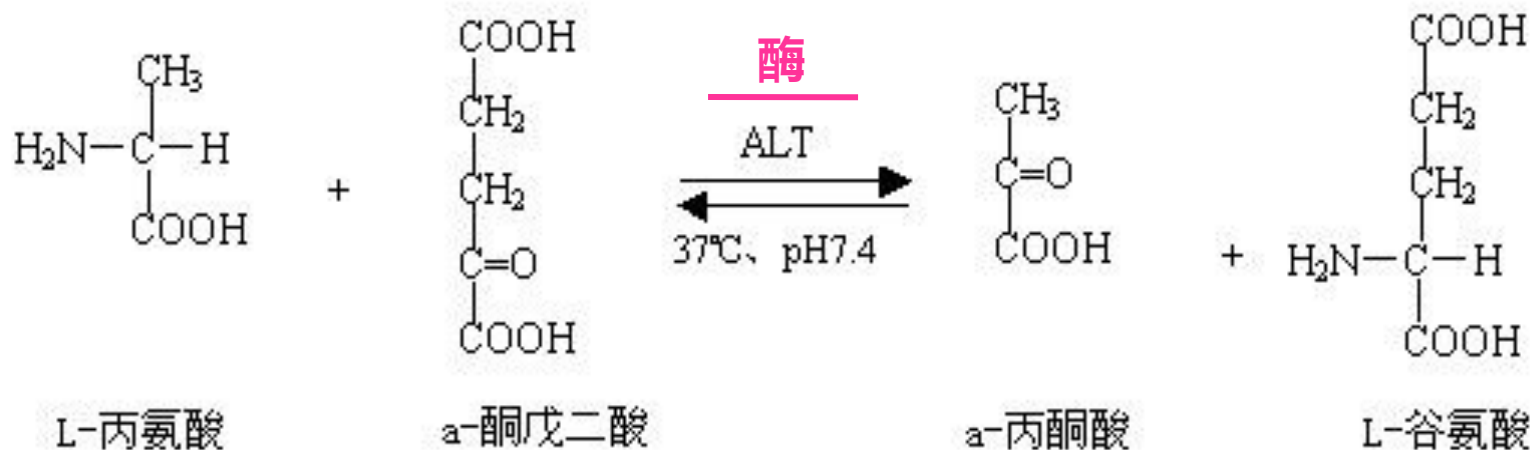
- **习惯单位**：60年代以前，酶单位没有统一的标准，都使用各自测定方法的习惯定义。因此不同酶、甚至同一酶不同测定法都可以有不同的定义。
- **国际单位**：61年酶学委员会建议使用统一单位，在特定条件下，**1分钟内转化1 μmol 底物所需的酶量** (IU/L或U/L)
- **卡门氏单位**：在温度25°C，pH7.4，波长340nm，光径1cm的条件下，1ml血清使反应液的吸光度下降0.001的转氨酶活性。

卡门氏单位和国际单位换算：**1 IU/L = 2.1 KarU**

Notice：国内多用37°C或30°C检测，因此这种换算是有误差的

实验原理

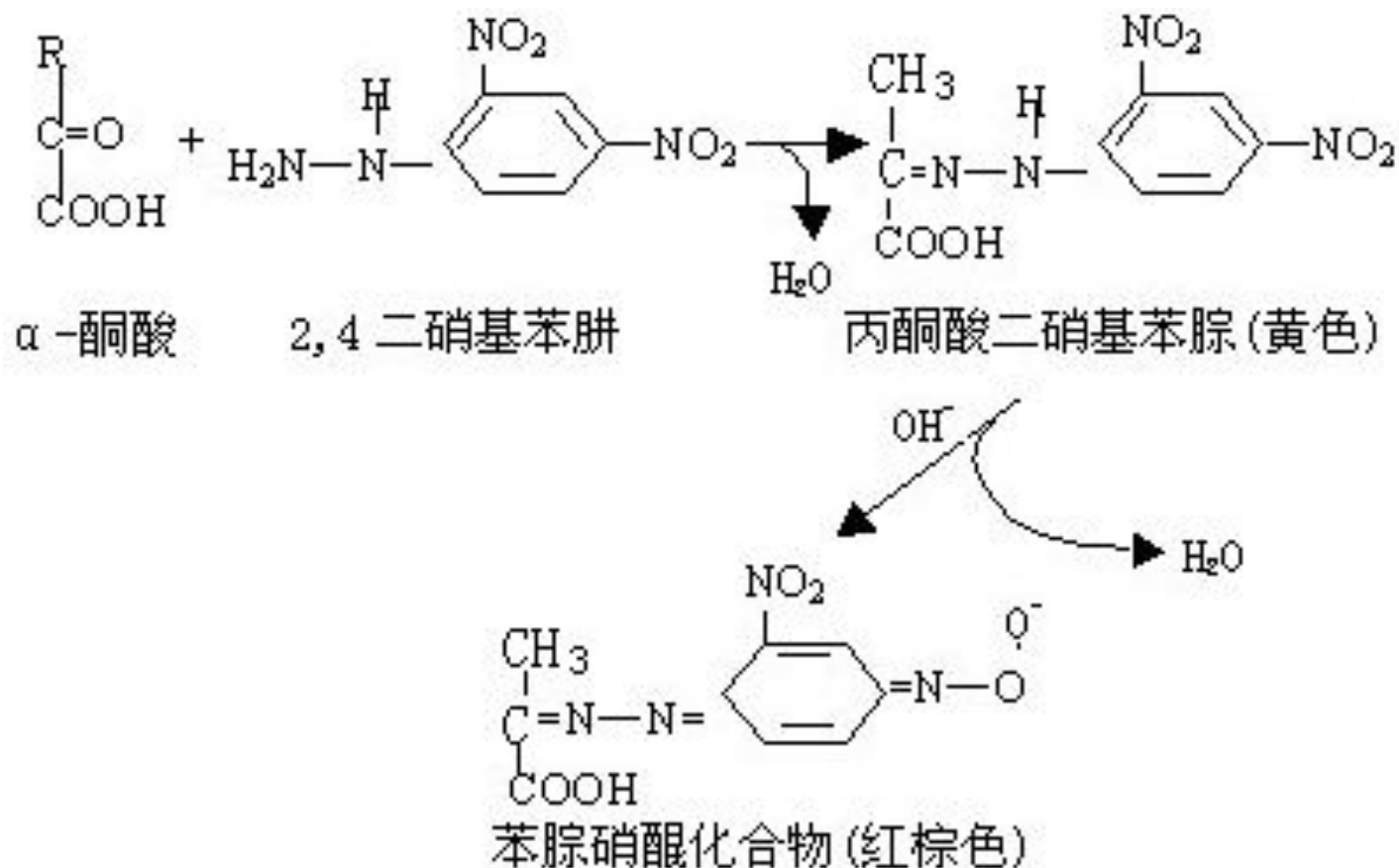
血清中的丙氨酸转氨酶（ALT），在37℃、pH7.4的条件下，可催化基质（底物）液中的丙氨酸与α-酮戊二酸生成谷氨酸和丙酮酸。



底物

产物

生成的丙酮酸可与**起终止和显色作用**的2,4二硝基苯肼发生加成反应，生成丙酮酸-2,4-二硝基苯腙，进而在**碱性环境**中生成红棕色的苯腙硝醌化合物，**其颜色的深浅在一定范围内与丙酮酸的生成量，亦即与ALT活性的高低成正比关系**。据此与同样处理的**丙酮酸标准液**相比较，便可算出或通过标准曲线查出血清中ALT的活性。



试剂盒组成成份

- (R1) 基质液 L-丙氨酸及 α -酮戊二酸
- (R2) 显色剂 2,4-二硝基苯肼
- (R3) NaOH
- 标准液 丙酮酸钠

实验步骤

- 血清GPT活性测定
- 标准曲线绘制：以各管酶活力单位的对数为横坐标，对应的吸光度为纵坐标，绘制工作曲线图。

标准曲线绘制: $y=0.0027x-0.0115$ (x:酶活性 ; y:A 值)

试剂 (μl)	0	1	2	3	4
蒸馏水	100	100	100	100	100
标准液	0	50	100	150	200
R1基质液	500	450	400	350	300
相当于酶活力 (KarU)	0	28	57	97	150
R2显色剂	500	500	500	500	500
混匀, 37℃恒温 20分钟					
R3NaOH	5000	5000	5000	5000	5000

混匀, 室温恒定3分钟, 505nm波长, 0号管调零, 测定各管吸光度, 制作工作曲线。

血清GPT活性测定：

试剂（μl）	空白（B）	测定（U）
样本	—	100
蒸馏水	100	—
R1基质液	500	500
混匀，37℃恒温 30分钟		
R2显色剂	500	500
混匀，37℃恒温 20分钟		
R3 NaOH	5000	5000

混匀，室温恒定3分钟， 505nm波长，空白管调零，测定各管吸光度。

注意事项

- 2, 4-二硝基苯肼可与有酮基的化合物作用形成苯腙硝醌化合物
- 溶血标本不宜采用，因血细胞内转氨酶活力较高，影响测定结果。
- 在测定时，如酶活力较大（大于150KarU），应将样品稀释后再进行测定

思考题

1. 为什么在制作标准曲线时要加入基质液？
2. 为什么在制作标准曲线时加入基质液的体积不同，对反应没有影响？
3. 在更换试剂时，为什么要重新绘制标准曲线？
4. 试分析影响实验结果的可能因素有哪些？
5. 溶血血清样品会引起什么样的不良后果？