

Stanovení ALT (Alaninaminotransferáza) v séru člověka

Teorie: Aminotransferázy jsou enzymy usnadňující přeměnu jedné aminokyseliny v jinou. Tím pomáhají udržovat vyvážený přísun aminokyselinových jednotek potřebných pro syntézu bílkovin. Zvýšená aktivita alaninaminotransferázy je významným indikátorem aktivity jater, srdce a kosterního svalstva.

V praxi jsou transaminázy látky tělu vlastní, které se obvykle nacházejí v buňkách. ALT transamináza je obsažena převážně v buňkách jater, srdce, kosterních svalů, ledvin, mozku a v červených krvinkách. Po jejich rozpadu přecházejí do krevního séra. Zvýšená hodnota ALT znamená tedy zvýšený rozpad buněk v těchto oblastech.

Norma: 0,06 – 0,14 ukat/l

Hraniční hodnota: 0,42 ukat/l

Úkol: Stanovit ALT v séru člověka

Pomůcky: stojánek na eppenndorfky

nastavitelné pipety

termolázeň na 37°C

ELISA-reader s filtrem o vlnové délce 340 nm

Princip metody: alaninaminotransferáza (L-alanin: 2-oxoglutarátaminotransferasa E.C.2.6.1.2) katalyzuje reakci mezi L-alaninem a 2-oxoglutarátem, které převádí na L-glutamát a pyrohroznan. Stanovení je založeno na měření absorbance hydrazonů kyseliny 2-oxoglutarové a pyrohroznové v alkalickém prostředí. Hydrazon kyseliny pyrohroznové má vyšší absorbanci.

L-alanin + oxoglutarát → pyruvát + L-glutamát

Pyruvát + NADH + H⁺ → laktát + NAD⁺

Katalytická koncentrace ALT je úměrná poklesu absorbance při 340 nm.

Činidla

R1. Pufr: Tris pufr pH=7,5, L-alanin, LD

LD ≥ 2,5 μkat

NADH ≥ 21,6 μmol/lahvičku

R2. Startér

NADH, 2-oxoglutarát 180 mmol/l

Azid sodný 0,1 %

Aktivátor

Pyridoxal-5-fosfát 6 μmol/tabletu

Kalibrace

BIO-LA-TEST LYONORM KALIBRÁTOR, kat. č. ..(1,40 μkat/l), 3204,3206

Příprava pracovního roztoku

Původně obsah flaštičky s činidlem 1 se rozpustí ve 100ml činidla 3. Po rozpuštění se přidají 2 tablety činidla 2.

Upraveno na: 25% hmotnosti obsahu lahvičky s činidlem 1 se rozpustí v 25ml roztoku činidla 3. Po rozpuštění se přidá půl tablety činidla 4.

Postup analýzy

Vzorky: nehemolytické sérum, heparinizovaná nebo EDTA plazma

Vlnová délka: 340 nm
ELISA destička
Teplota: 37 °C

Druh vzorku		Pracovní roztok	10min inkubace	Činidlo 2
Vzorek séra	10 µl	100 µl		10 µl
Blank (Fyz. roztok)	10 µl	100 µl		10 µl
Standard 10x ředěný	10 µl	100 µl		10 µl
Standard koncentrovaný	10 µl	100 µl		10 µl

Použije se blank, použije se Lyonorm (biochemický) jako standard
Promíchá se a inkubuje 10 minuty při 37 °C
Přidá se činidlo 2 v množství 10µl

Promíchá se, inkubuje se 2 a minuty při 37 °C měří se absorbance v 1 minutových intervalech nejméně po dobu 3 minut. Vypočte se průměrná změna absorbance za 1 min (\bar{A}).

\bar{A} = průměr ($A_1+A_2+A_3$)