# **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 37oC

 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 kysein 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 4.

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 2x ředěný | 10 µl | 100 µl |  | 10 µl |
| Blank (Fyz. roztok) | 10 µl | 100 µl |  | 10 µl |
| Standard 2x 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 (δA).

## δA= průměr (A1+A2+A3)