

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

Norma: 0,06 – 0,14 µkat/l

Hraniční hodnota: 0,42 µkat/l

### **Úkol: Stanovit ALT v séru člověka**

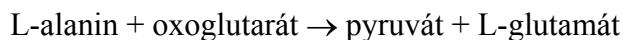
**Pomůcky:** stojánek na eppendorfkы

nastavitelné pipety

termolázeň na 37°C

ELISA-reader s filtrem o vlnové délce 500-530 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.



Katalytická koncentrace ALT je úměrná poklesu absorbance při 340 nm.

#### **Činidla**

1. Enzym: NADH

LD ≥ 2,5 µkat

NADH ≥ 21,6 µmol/lahvičku

#### 2. Startér

2-oxoglutarát 180 mmol/l

Azid sodný 0,1 %

#### 3. Pufr – substrát

Tris 120 mmol/l

L-alanin 800 mmol/l

Azid sodný 0,1 %

#### 4. Aktivátor

Pyridoxal-5-fosfát 6 µmol/tabletu

#### **Složení inkubační směsi**

Trisový pufr, pH 7,2 (37 °C): 100 mmol/l

L-alanin: 660 mmol/l

Laktátdehydrogenáza (LD): ≥ 25 µkat/l

NADH: ≥ 180 µmol/l

2-oxoglutarát: 15 mmol/l

Pyridoxal-5-fosfát: 100 µmol/l

Objemový poměr sérum/inkubační směs: 1/12

#### Kalibrace

BIO-LA-TEST LYONORM KALIBRÁTOR, kat. č. 10003200 (1,36 µkat/l)

#### Příprava procovního roztoku

Obsah lahvičky s činidlem 1 se rozpustí ve 100 ml roztoku činidla 3. Po rozpuštění se přidají 2 tablety činidla 4.

#### Postup analýzy

Vzorky: nehemolytické sérum, heparinizovaná nebo EDTA plazma

Vlnová délka: 340 nm

Kyveta: 1 cm

Teplota: 37 °C

pracovní roztok	100 µl
sérum	10 µl
promíchá se a inkubuje 10 minut při 37 °C a přidá se:	
činidlo 2	10 µl

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

#### Výpočet

$$\text{ALT } (\mu\text{kat/l}) = (\Delta A) \times 31,7$$