

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 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

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: $\geq 180 \mu\text{mol/l}$
2-oxoglutarát: 15 mmol/l
Pyridoxal-5-fosfát: 100 $\mu\text{mol/l}$
Objemový poměr sérum/inkubační směs: 1/12

Kalibrace

BIO-LA-TEST LYONORM KALIBRÁTOR, kat. č. 10003200 (1,36 $\mu\text{kat/l}$)

Příprava pracovního 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 (ΔA).

Výpočet

ALT ($\mu\text{kat/l}$)= (ΔA) x 31,7