

## **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 µkat/l

Hraniční hodnota: 0,42 µkat/l

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

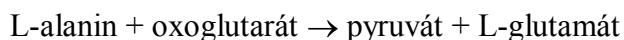
**Pomůcky:** stojánek na eppendorfkы

nastavitelné pipety

termolázeň na 37°C

ELISA-reader s filtrem o vlnové délce 340 nm

**Princip metody:** alaninaminotransferáza (L-alanin: 2-oxoglutarátaminotransfера 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

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. 10003200 (1,36 µkat/l), 3204,3206

### Příprava pracovního roztoku

25% hmotnosti obsahu lahvičky 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

pracovní roztok	100 µl
sérum	10 µl

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 průměrná změna absorbance za 1 min ( $\square A$ ).  
 $\square A = \text{průměr } (A_1+A_2+A_3)$