

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:

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

LD ≥ 2,5 μkat

NADH ≥ 21,6 μmol/lahvičku

2. Startér

2-oxoglutarát 180 mmol/l

Azid sodný 0,1 %

3. Tlumivý roztok – substrát

Tris 120mmol/l

L-alanin 800mmol/l

Azid sodný 0,1%

4. 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 s činidlem 1 se rozpustí v 25ml roztoku činidla 3. Po rozpuštění se přidá půl tablety činidla 4. Propočítat na množství vzorků a podle toho připravit množství prac. roztoku.

Postup analýzy

Vzorky: nehemolytické sérum, heparinizovaná nebo EDTA plazma

Vlnová délka: 340 nm

ELISA destička

Teplota: 37 °C

pracovní roztok	100 μ l
sérum vzorku nebo kontroly	10 μ l

Použije se blank a standardní sérum

Promíchá se a inkubuje 10 minuty při 37 °C

Přidá se činidlo 2 v množství 10 μ l

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 ($\square A$).

$\square A$ = průměr (A1+A2+A3).

Referenční hodnoty:

ALT μ kat/l 37°C

Muži 0,2-0,8

Ženy 0,2-0,6

Každá laboratoř má svou hodnotu, která se může mírně lišit.

Hodnotu vzorku porovnat s hodnotou standardu.