

[Akceptuje](#)

W ramach naszej witryny stosujemy pliki cookies w celu świadczenia państwu usług na najwyższym poziomie, w tym w sposób dostosowany do indywidualnych potrzeb. Korzystanie z witryny bez zmiany ustawień dotyczących cookies oznacza, że będą one zamieszczone w Państwa urządzeniu końcowym. Możecie Państwo dokonać w każdym czasie zmiany ustawień dotyczących cookies. Więcej szczegółów w naszej [Polityce Prywatności](#)

[Portal](#) [Informacje](#) [Katalog firm](#) [Praca](#) [Szkolenia](#) [Wydarzenia](#) [Porównania międzylaboratoryjne](#)
[Kontakt](#)



[Laboratoria](#)
[.net](#)
[Innowacje](#)
[Nauka](#)
[Technologie](#)

[Logowanie](#) [Rejestracja](#) [pl](#)

Newsletter

zapisz się



- [Nowe technologie](#)
- [Felieton](#)
- [Tygodnik "Nature"](#)
- [Edukacja](#)
- [Artykuły](#)
- [Przemysł](#)

[Strona główna](#) > [Artykuły](#)

Aminotransferaza alaninowa (ALT) i asparaginowa (AST): oznaczanie i charakterystyka enzymów



Aminotransferazy powszechnie występują w komórkach zwierząt, roślin, jak i mikroorganizmów. Enzymy te katalizują szereg reakcji, które odgrywają kluczową rolę w metabolizmie, w tym: aminokwasów, witamin, czy glukoneogenezie (kluczowym enzymem glukoneogenezy jest aminotransferaza alaninowa-ALT) [2], [7].

Jako enzymy zaliczane są do grupy transferaz, które to odpowiedzialne są za przenoszenie grupy aminowej z aminokwasu (dawcy grupy) na 2-oksokwas (będącego biorcą grupy) [2].

Oznaczanie dwóch aminotransferaz tj. aminotransferazy asparaginianowej (AST, GOT-glutamic oxaloacetic transaminase) i alaninowej (ALT, GPT-glutamic pyruvic transferase) jest szeroko stosowane w analityce enzymologicznej. W komórce aminotransferaza alaninowa zlokalizowana jest w cytoplazmie, z kolei asparaginianowa (AST) w mitochondrium i cytoplazmie. I tak AST ma swój izoenzym mitochondrialny i izoenzym cytoplazmatyczny. Znane są także dwa izoenzymy dla aminotransferazy asparaginianowej tj. ALT1, który kodowany jest przez gen położony na chromosomie 8, oraz ALT2 dla którego gen zlokalizowany jest na chromosomie 16 [1]. Zarówno AST, jak i ALT występują w różnych narządach, poziom ALT w tkankach pozawątrobowych jest niski.

Oznaczanie AST i ALT w diagnostyce klinicznej

Aminotransferazy asparaginianowa i alaninowa występują m.in. w komórkach mięśnia serowego czy w komórkach mięśni szkieletowych. Poziom aminotransferazy alaninowej w komórkach mięśniowych jest bardzo niski. Oznaczanie obydwu enzymów ma bardzo duże znaczenie diagnostyczne. W przypadku uszkodzenia komórek wątroby dochodzi do wzrostu aktywności obydwu enzymów w osoczu w stosunku charakterystycznym dla hepatocytów. Tak więc, wzrost tego poziomu jest markerem uszkodzenia wątroby [1]. Z kolei, AST ze względu na powszechność występowania, wzrost jego aktywności obserwowany jest w trakcie uszkodzenia komórek każdego narządu. Bardzo duży wzrost aktywności AST w surowicy obserwuje się w rozległych uszkodzeniach mięśni (przekroczenie górnego zakresu wartości referencyjnych może być nawet 100-krotne). Ponadto, znaczny wzrost AST obserwuje się również w zawale mięśnia sercowego, oraz wspomnianych już ostrych fazach uszkodzeń wątroby. Wzrost aktywności AST w surowicy pociąga za sobą również wzrost ALT, jednak ALT wzrasta nieznacznie. Tak więc, stosunek aktywności AST do ALT odpowiada w przybliżeniu stosunkowi obydwu enzymów w komórkach narządu, który to uległ uszkodzeniu. W związku z małą specyficznością narządową, analiza poziomu aktywności aminotransferaz ma ograniczoną użyteczność diagnostyczną [1].

Reitman i Frankel (1957) przedstawili prostą, kolorymetryczną metodę szacowania aktywności aminotransferaz w surowicy wykorzystującą różnice we współczynnikach ekstynkcji alkalicznych roztworów z 2,4-dinitrofenylo-hydrazyną, alfa-ketoglutaranem, szczawiooctanem i pirogronianem, umożliwiając tym samym pomiar szybkości reakcji przez oznaczenie szybkości zachodzących zmian absorbancji [3].

Oznaczanie aktywności AST i ALT za pomocą zmodyfikowanej metody Reitmana i Frankela

Aminotransferazy przenoszą grupy aminowe z α -aminokwasów na odpowiednie 2-oksokwasy. Za miarę aktywności tych dwóch enzymów uznaje się ilość powstałych w wyniku reakcji oksokwasów. Oksokwasy oznaczane są jako fenylohydrazony, które to w zasadowym środowisku dają brunatno-czerwone zabarwienie [4].

Jak już wspomniano aminotransferazy (GOT i GPT) są enzymami wstępującymi w organizmie, a ich najwyższą aktywność obserwuje się w sercu, wątrobie, mięśniach szkieletowych, nerkach i erytrocytach. W normalnych (prawidłowych) warunkach, aktywność tych enzymów w surowicy jest bardzo niska lub równa zero. Wszelkie zmiany w tkankach powodują w następstwie zwiększenie ich stężenia w surowicy. Ostry zawał mięśnia sercowego, przyczynia się do wysokiego wzrostu poziomu sercowego AST (GOT). Najwyższe poziomy ALT (GPT) obserwuje się u pacjentów z wirusowym zapaleniem wątroby i chorobami wątroby.

Zasada działania testu (wg procedury Wienerlab ze strony: http://www.wiener-lab.com.ar/wiener/catalogo/archivos/6306_transaminasas200_en.pdf)

GOT katalizuje reakcję:

GOT

L-asparaginian + α -ketoglutaran \rightarrow glutaminian + szczawiooocetan

Z kolei, GPT katalizuje reakcję:

GPT

L-alanina + α -ketoglutaran \rightarrow glutaminian + pirogronian [6].

Aminotransferaza odpowiedzialna jest za przenoszenie grupy aminowej z alaniny na α -ketoglutaran. Produktem tej reakcji jest pirogronian oraz glutaminian. W momencie związania alaniny do enzymu dochodzi do usunięcia grupy aminowej, która to przeniesiona jest na fosforan pirydoksalu (PLP), spełniającego rolę koenzymu zarówno aminotransferaz, jak również liaz. Wtedy też z aminotransferazy uwalnia się pirogronian. W reakcji bierze udział również drugi substrat- α -ketoglutaran, który wiąże się do „zmodyfikowanego” enzymu, w wyniku czego przyjmuje od niego grupę aminową. W kolejnym etapie, już jako glutaminian, produkt ten zostaje uwolniony. Opisana reakcja nazywana jest tzw. reakcją podwójnego przeniesienia (mechanizm podwójnego przeniesienia) [8].

Utworzony w wyniku reakcji pirogronian (szczawiooocetan jest niestabilny i jest przekształcany do pirogronianu) reaguje z 2,4-dinitrofenylohydrazyną, dając w środowisku zasadowym barwny związek, który następnie może być mierzony przy absorbancji równej 505 nm [5].

Warunki przeprowadzania oznaczeń z wykorzystaniem powyższego testu:

- oznaczenie wykonuje się z wykorzystaniem spektrofotometru przy długości fali równej $\lambda=505$ nm, lub fotokolorymetru z zielonym filtrem w zakresie 500-550 nm

- temperatura reakcji: 37°C
- czas reakcji: 40 minut
- objętość próbki: 100 µl
- końcowa objętość reakcji: 6,1 ml

Powyższe (zalecane) parametry reakcji (wielkości próbek i odczynników) można proporcjonalnie zmniejszać w trakcie wykonywania oznaczenia [5].

Wykonanie oznaczenia z użyciem testu (wg procedury Wienerlab ze strony: http://www.wiener-lab.com.ar/wiener/catalogo/archivos/6306_transaminasas200_en.pdf)

Oznaczenie wykonuje się w dwóch próbkach, tj. próbce kontrolnej oraz próbce badanej.

Zestaw testowy zawiera 3 odczynniki (reagenty) : A, B i C

Odczynnik A (GOT): roztwór zawierający 100 mmol/l L-asparaginian oraz 2mmol/l α-ketoglutaran w buforze fosforanowym (100mmol/l) o pH=7.4

Odczynnik A (GPT): roztwór zawierający 200mmol/l dl-alaniny i 2mmol/l α-ketoglutaranu w 100mmol/l buforu fosforanowego o pH-7.4

Odczynnik B: 1mmol 2,4-dinitrofenylohydrazyna (2,4-DNPH) w 1mol/l roztworu kwasu chlorowodorowego

Odczynnik C: 4mol/l roztwór wodorotlenku sodu

Standard: 2mmol/l roztwór pirogronianu sodu , używany przy wykreślaniu krzywej kalibracyjnej wykorzystywanej do obliczeń [5].

1. Do próbki kontrolnej oraz badanej dodać po 0,5 ml odczynnika A (GOT lub GPT). Próbki inkubować w łąźni wodnej w temperaturze 37°C przez kilka minut.
2. Następnie, do próbki badanej dodać 100 µl surowicy, z kolei do próbki kontrolnej 100 µl wody destylowanej.
3. Próbki dokładnie wymieszać, po czym ponownie inkubować w 30°C. Po upływie czasu inkubacji do obydwu próbek (kontroli i badanej) należy dodać 0,5 ml odczynnika B.
4. Próbki dokładnie wymieszać, poinkubować 10 min w temperaturze 37°C, a następnie dodać do każdej po 5 ml odczynnika C. Wymieszać przez obracanie próbki, wyjąć z kąpeli wodnej, a po upływie 2 minut wykonać oznaczenie z wykorzystaniem kolorymetru z zielonym filtrem (pomiar w zakresie 500-550 nm) lub spektrofotometru w zakresie 505 nm [5].

PROCEDURE		
In two test tubes labeled B (Blank) and U (Unknown), place:		
	B	U
Reagent A (GOT or GPT)	0.5 ml	0.5 ml
Place tubes in water bath at 37°C ± 0.5°C a few minutes, then add:		
Serum	-	100 ul
Distilled water	100 ul	-
Mix by shaking gently. Incubate exactly 30 minutes, and add:		
Reagent B	0.5 ml	0.5 ml
Mix. Let tubes stand 10 minutes at 37°C. Then add:		
Diluted Reagent C	5 ml	5 ml
Mix by inversion and remove from bath. After two minutes, read in colorimeter with green filter (500-550 nm) or in spectrophotometer (505 nm, Hg 546), setting instrument to zero O.D. with distilled water.		

Zdjęcie: Procedura wykonywania oznaczenia testem Transaminasas 200 firmy Wienerlab (procedura Wienerlab ze strony: http://www.wiener-lab.com.ar/wiener/catalogo/archivos/6306_transaminasas200_en.pdf)

Oznaczanie aktywności aminotransferazy asparaginianowej

Metoda I:

1) Aktywność enzymatyczną AST można oznaczać z wykorzystaniem 0.1 M buforu fosforanowego (pH=7.5), który dodatkowo zawiera: 0,2 M L-asparaginian, 0,13mM NADH, dehydrogenazę jabłczanową (0,7 jednostek aktywności) oraz badany roztwór enzymu. Reakcję enzymatyczną rozpoczyna się poprzez dodanie do próbki. 10mM 2-oksoglutaranu. Zastosowanie w reakcji L-asparaginianu w dużym nadmiarze w porównaniu do ilości użytego 2-oksoglutaranu powoduje, że zostaje przesunięta równowaga reakcji transaminacji (w kierunku tworzenia się L-glutaminianu oraz szczawiooctanu) [6].

Następnie, powstający w reakcji wspomniany już szczawiooctan oznaczany jest przy udziale dehydrogenazy jabłczanowej oraz NADH. Oznaczenie wykonuje się przy $\lambda=340$ nm (spadek absorbancji w wyniku utleniania NADH jest proporcjonalny do aktywności enzymatycznej aminotransferazy AST) [6].

Metoda II:

2) Jako materiał do oznaczenia można wykorzystać np. niedojrzałe nasiona zielonego grochu, z których przygotowuje się analizowaną próbkę, a dokładniej: 1 g nasion należy rozetrzeć

w mózdzierzu z dodatkiem , stopniowo dodając 1ml 100 mM buforu Tris-HCl (pH=8.0). Następnie, dokładnie rozdrobioną próbkę należy przemieścić do probówki typu Eppendorf i odwirować przy 15000 obr./min przez 15 minut. Do dalszych oznaczeń aktywności używa się otrzymany po wirowaniu supernatant, rozcieńczony 5x za pomocą buforu Tris-HCl (jak wyżej).

Przygotowanie próbki do pomiaru w kuwecie kwarcowej:

Zmieszać razem 500 µl 100 mM buforu Tris-HCl (pH=8.0) zawierającego 20 mM α-ketoglutaran, 100 µl NADH+H⁺ (tj. 2,5mM roztwór NADH+ H⁺), 100µl dehydrogenazy mleczanowej (o aktywności ok. 1,2jednostki w 100µl - roztwór przygotowany w 100mM buforze Tris-HCl). Na końcu do próbki dodać 100µl ekstraktu tkankowego (otrzymany rozcieńczony supernatant). Kuwete umieścić w spektrofotometrze, po czym należy sprawdzić stabilność układu, a dalej zapoczątkować reakcję transaminacji. Reakcję tą zapoczątkowuje się przez dodanie do próbki 200µl 350 mM roztworu alaniny (350 mM roztwór alaniny w 100mM buforze Tris-HCl o pH=8.0). Od tego momentu rozpoczyna się pomiar spadków absorbancji przy długości fali równej λ=340 nm (w czasie ok. 10 minut).

Na podstawie otrzymanych wyników oblicza się średnią wartość zmiany wartości absorbancji (ΔA) przez czas (min) tj. ΔA/min. Następnie, oblicza się aktywność aminotransferazy alaninowej, która wyrażana jest jako ilość nmoli pirogronianu (powstającego w trakcie zachodzenia reakcji enzymatycznej) w ciągu jednej minuty [8].

Sprzężony test Warburga - oznaczanie aktywności AST i ALT [9].

Wykonanie:

Do roztworu roboczego dla AST lub ALT w objętości 2 ml, wcześniej ogrzanego do temp. 37°C, należy dodać 0,2 ml surowicy (surowica bez hemolizy). Próbkę inkubować w 37°C przez 10 minut (inkubację prowadzić w termostатовanej kuwecie).

Po upływie czasu inkubacji do próbki dodać 0,2 ml 2-oksoglutaranu (tj. 0,18 M roztwór 2-oksoglutaranu w 0,11 M roztworze Tris-HCl o pH=7,5). Zmierzyć wartość absorbancji przy λ=340 nm co 1 minutę, przez okres minimum 5 minut. Na podstawie otrzymanych wyników oblicza się zmianę wartości A w ciągu 1 minuty. Aktywność aminotransferaz w U/l oblicza się z zastosowaniem poniższego wzoru:

$$U/l = \Delta A / \text{min} \times 2,4 \text{ ml} \times 1000 \text{ ml} / 6,22 \times 0,2 \text{ ml} = \Delta A / \text{min} \times 1929$$

Gdzie:

6,22 - to minimalowy współczynnik absorbancji dla NADH. Współczynnik ten odpowiada stężeniu 1 µmol/ml

2,4 ml - końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej

0,2 ml - objętość surowicy (użytej w doświadczeniu do oznaczenia) [9].

Pomiar aktywności ALT w żelu poliakrylamidowym- elektroforeza

Przygotowanie 7,5% żelu rozwijającego: 1,5M bufor Tris-HCl pH=8.8, z dodatkiem 10% mannitolu, oraz 4% żelu zagęszczającego (0,5M bufor Tris-HCl pH=6.8). Elektroforeza produktó prowadzona

jest w buforze Tris-glicyna (pH=8.3). Jako znacznik stosuje się błękit bromofenyłowy. Rozdział prowadzony jest tak długo, aż z żelu nie wyjdzie powyższy znacznik [6].

Po rozdziale elektroforetycznym żel barwiony jest metodą Stejskala (1994). Rozdzielony żel poddawany jest 20-minutowej inkubacji w 0,1M buforze Tris o pH=7.5 zawierającym: 5 mM 2-oksoglutaran, 0,1M PLP (fosforan pirydoksalu), 0,5M MTT (3-[4,5-dimetyltiazol-2-yl]-2,5-difenyl-tetrazolium bromidyny, 8mM CSA (sulfinylocysteina), 0,1 mM N-metylofenazyli metasulfonian (m-PMS). Przy udziale sulfinylocysteiny zachodzi reakcja transaminacji, w wyniku czego powstaje sulfinylopirogonian. Związek ten ulega następnie rozkładowi do pirogonganian oraz kwasu sulfonowego (jon kwasu sulfonowego). W dalszej kolejności jon utlenia się przy udziale PMS i MTT. Po zredukowaniu MTT powstaje nierozpuszczalny chromofor koloru ciemno-niebieskiego, który świadczy o występowaniu aktywnej formy ALT [6].

Autor: Lidia Koperwas

Literatura:

[1]. Szutowicz A., Raszei-Szpecht A., 2009. Diagnostyka laboratoryjna. Tom I.Gdański Uniwersytet Medyczny, Zlecenie KW/224/09.Recenzent prof. dr hab.Wiesława Łysiak-Szydłowska, s. 57, 61-62

[2]. Kędziorek M.E., Zagdańska B.M., 2011. Aminotransferaza alaninowa w roślinach wyższych. Postępy Biologii Komórki Tom 38 2011 NR 3, (533-544). <http://www.pbkom.pl/pbkom/roczniki/pdf2011/pbk%2011-3/s533-544.pdf>

[3]. Reitman S., Frankel S., 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. Amer. J. Clin. Pathol. 28: 56-63, 1957. <http://garfield.library.upenn.edu/classics1979/A1979HZ21900001.pdf>

[4]. <http://biblioteka.gumed.edu.pl/admin/ckfinder/userfiles/files/pdf/skrypt.pdf>

[5]. Procedura oznaczania aminotransferaz za pomocą testu Transaminasas 200 firmy Wienerlab, procedura ze strony http://www.wienerlab.com.ar/wiener/catalogo/archivos/6306_transaminasas200_en.pdf

[6]. Maciąga M., 2002. ANALIZA ZYMOGRAMÓW AMINOTRANSFERAZY ASPARAGINIANOWEJ U TRAW Z RODZAJÓW TRITICUM I AEGILOPS. Praca magisterska, SGGW, Warszawa 2002. Pod kierunkiem Prof. Dr hab. A.Paszowskiego . <http://d-artagnan.x10.mx/nauka/pracamag.pdf>

[7]. Liu L, Zhong S, Yang R, Hu H, Yu D, Zhu D, Hua Z, Shuldiner AR, Goldstein R, Reagan WJ, Gong DW, 2008. Expression, purification, and initial characterization of human alanine aminotransferase (ALT) isoenzyme 1 and 2 in High-five insect cells.

[8]. http://www.biol.umk.pl/zaklady/dydakt_biochem/biol_ros_5.pdf

[9]. Kłyszajko-Stefanowicz L, 2003. Ćwiczenia z biochemii. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2003, s.552-554.

<http://laboratoria.net/artukul/20320.html>

Informacje dnia: [Jak otworzyć laboratorium? Dziękujemy za odwiedzin na targach Labs Expo W przyszłości będziemy jedli mięso z drukarki Ruszył nabór na wspólne projekty przedsiębiorców i naukowców; w puli 66 mln zł Błonica - choroba groźna także dla dorosłych 87% internautów uważa hejt za poważny problem społeczny](#) [Jak otworzyć laboratorium? Dziękujemy za odwiedzin na targach Labs Expo W przyszłości będziemy jedli mięso z drukarki Ruszył nabór na wspólne projekty przedsiębiorców i naukowców; w puli 66 mln zł Błonica - choroba groźna także dla dorosłych 87% internautów uważa hejt za poważny problem społeczny](#) [Jak otworzyć laboratorium? Dziękujemy za odwiedzin na targach Labs Expo W przyszłości będziemy jedli mięso z drukarki Ruszył nabór na wspólne projekty przedsiębiorców i naukowców; w puli 66 mln zł Błonica - choroba groźna także dla dorosłych 87% internautów uważa hejt za poważny problem społeczny](#)

Partnerzy