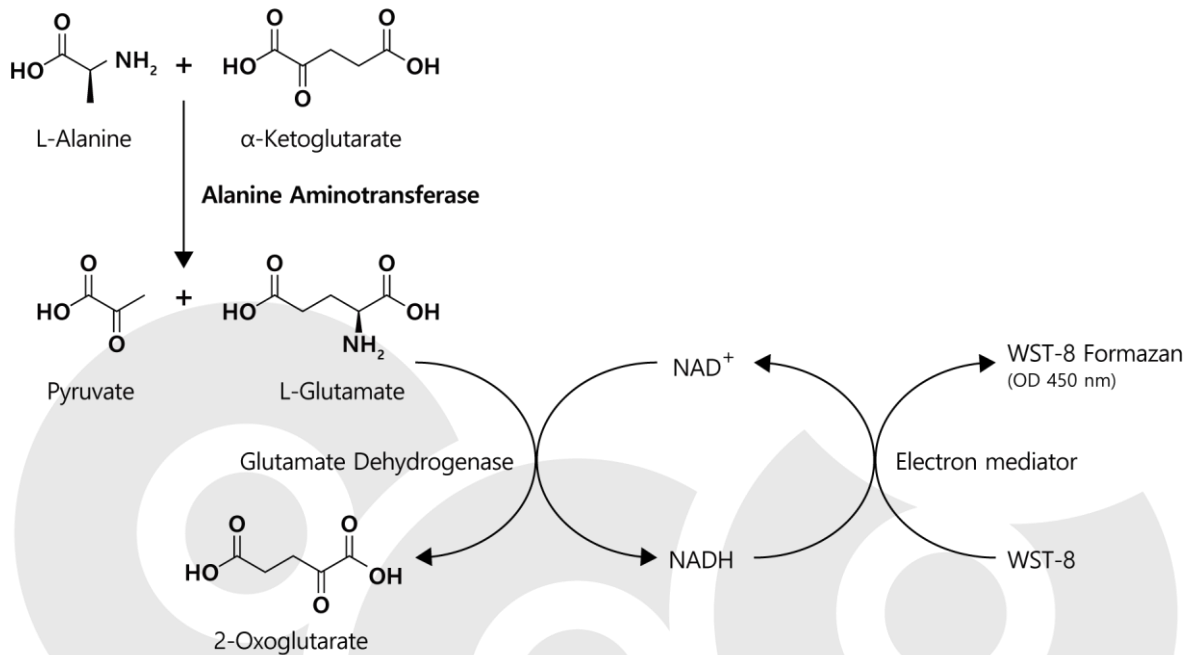


PicoSens™ ALT Assay Kit

(Colorimetric)

BM-ALT-100, 100 assays

제품 원리



Glutamic-pyruvic transaminase (GPT, SGPT)로도 알려져 있는 Alanine aminotransferase(ALT)는 Alanine에서 α-Ketoglutarate로 α-Amino group을 전달하는 것을 촉매하여 Glutamate와 Pyruvate를 생성합니다. BIOMAX PicoSens™ ALT Assay Kit (Colorimetric)는 Glutamate dehydrogenase가 ALT에 의해 생성된 Glutamate를 2-Oxoglutarate로 전환하며 이때 NAD⁺가 NADH로 환원됩니다. NAD⁺와 NADH의 산화 환원 순환 반응에서 NADH가 산화될 때 발생하는 수소원자와 WST-8이 반응하여 WST-8 Formazan을 형성하게 되고 이는 흡광도 450 nm에서 측정됩니다. 이를 통해 ALT에 의해 생성된 Glutamate의 농도를 확인할 수 있으며, 이를 통해 ALT 능력을 평가할 수 있습니다.

제품의 구성 및 보관 조건

Components	Size	Storage
10X ALT Assay Buffer	25 ml	-20°C
ALT Enzyme Mix	150 µl	
ALT Substrate Mix	1.5 ml	
ALT Probe	1 ml x 3 vials	
ALT Positive Control	50 µl	
ALT CoEnzyme	300 µl	
ALT Standard (100 mM)	100 µl	

* 개봉하지 않은 제품은 빛을 차단한 상태에서 -20 °C 보관 시 약 6개월간 안정적입니다.

검사 필요 장비 및 소모품

- ▶ 96-well Microplate (Clear, Flat bottom)
- ▶ Pipette & Sterile tips
- ▶ D.W.
- ▶ Colorimetric microplate reader (450 nm Filter / 37 °C)
- ▶ Cold PBS
- ▶ Microtube
- ▶ 15 or 50 ml Conical tube
- ▶ Micro centrifuge (4°C)

실험 전 준비 사항 및 보관 방법

- 제품의 모든 구성품은 상온에서 놔두어 완전히 녹인 후 사용합니다.
- Vial 뚜껑 내부에 시약이 묻어 있을 수 있으니 개봉 전 원심 분리합니다.

1X ALT Assay buffer

10X ALT Assay Buffer 5 ml과 D.W. 45 ml을 혼합하여 준비합니다. 사용 후 4°C 또는 -20°C에 보관하며 희석된 용액은 6개월 이내에 사용합니다.

ALT Positive control

1X ALT Assay Buffer로 1:100 희석하여 사용하며, 사용량만큼만 제조하여 사용합니다. 사용 후 4°C 또는 -20°C에 보관하며 희석된 용액은 재사용을 권장하지 않습니다. (Well 당 사용량 50 µl)

ex) ALT Positive Control 5 µl + 1X ALT Assay Buffer 495 µl

ALT CoEnzyme solution

사용 후 -20°C 또는 -80°C에 보관하며 희석된 용액은 재사용을 권장하지 않습니다.

1 mM ALT Standard

ALT Standard (100 mM)를 1X ALT Assay Buffer로 1:100 희석하여 최종 농도 1 mM로 만들어 사용합니다.

ex) ALT Standard (100 mM) 10 µl + 1X ALT Assay Buffer 990 µl

Sample type

- Serum, Plasma
- Tissues
- Cell suspensions

Sample preparation

모든 Sample은 Fresh한 상태이어야 하며, -80 °C에서 보관하더라도 1~2 개월 이상 된 Sample을 측정할 시 결과값이 떨어질 수 있습니다. 미지의 시료 또는 처음 측정하는 시료의 경우 측정값이 Standard curve 내에 위치하도록 예비실험을 하신 후 사용을 권장합니다.

- 측정 Sample의 Several dilution을 준비하여 실험을 진행합니다. 이때 1X ALT Assay buffer로 희석합니다.
- 실험 후 보관 시 -80°C에서 보관합니다.

Tissues

- ① Tissue (500~1000 mg)를 가위 또는 Dounce homogenizer 등으로 완전히 액화될 때까지 다져줍니다.
- ② Cold PBS 또는 1X ALT Assay buffer 2 ml을 넣고 Homogenize 또는 sonication 한 후 10 min 간 Ice에 넣어줍니다.
- ③ 10 sec 동안 Vortexing 후 5 min 간 Ice에 넣어줍니다.
- ④ 4°C에서 12,000 x g로 10 min 간 Centrifuge를 합니다.
- ⑤ Supernatant를 새로운 Microtube로 옮긴 후 Ice에 넣어두고 실험에 사용합니다.

Cell suspensions

- ① Cell pellet (1×10^6 cells)에 Cold PBS 또는 1X ALT Assay buffer 0.2 ml을 넣고 Homogenize 한 후 10 min 간 Ice에 넣어줍니다.
- ② 10 sec 동안 Vortexing 후 5 min 간 Ice에 넣어줍니다.
- ③ 4°C에서 12,000 x g로 10 min 간 Centrifuge를 합니다.
- ④ Supernatant를 새로운 Microtube로 옮긴 후 Ice에 넣어두고 실험에 사용합니다.

Serum

- ① Anticoagulant를 사용하지 않고 혈액 시료를 채혈합니다.
- ② 상온에서 30 min 동안 혈액 시료가 응고되도록 합니다.
- ③ 4°C에서 2,000 x g로 10 min 간 Centrifuge를 합니다.
- ④ Serum 층을 새로운 Microtube로 옮긴 후 Ice에 넣어두고 실험에 사용합니다.
 - 이때 White buffy coat를 건들지 않도록 주의합니다.

Plasma

- ① Heparin 또는 Sodium citrate를 사용하여 혈액 시료를 채혈합니다. (EDTA는 사용하지 마십시오.)
- ③ 4°C에서 1,000 x g로 10 min 간 Centrifuge를 합니다.
- ③ Plasma 층을 새로운 Microtube로 옮긴 후 Ice에 넣어두고 실험에 사용합니다.
 - 이때 White buffy coat를 건들지 않도록 주의합니다.

Standard preparation

앞서 준비해 놓은 1 mM ALT Standard 125 μ l와 1X ALT Assay buffer 375 μ l를 혼합하여 250 μ M STD No. 1을 만들어 1/2 씩 Serial dilution하여 6 구간의 Standard solution을 아래 표와 같이 만들어 사용합니다.

STD No.	STD Stock	Vol. of STD Stock (μ l)	1X ALT Assay buffer(μ l)	STD Concentration(μ M)	Final STD Amount in well (nmol/well)
1	1 mM ALT Standard	125	375	250	12.5
2	STD No. 1	250	250	125	6.25
3	STD No. 2	250	250	62.5	3.13
4	STD No. 3	250	250	31.3	1.57
5	STD No. 4	250	250	15.6	0.78
Blank	-	-	250	0	0

실험 과정

- * 미지의 Sample 또는 처음 측정하는 Sample의 경우 측정값이 Standard curve 내에 위치하도록 예비 실험 진행 후 사용을 권장합니다.
- * Duplicate 또는 Triplicate를 권장합니다.

- ① 준비한 Standard solution을 각 Standard well에 50 μ l씩 분주합니다.
- ② 희석된 ALT Positive control을 Positive control well에 50 μ l씩 분주합니다.
- ③ 준비된 Sample 50 μ l를 Sample well에 분주합니다.
- ④ Reaction mix를 아래와 같이 만들어 준비합니다.

Kit components (Colorimetric)	Reaction mix (150 μ l/well)
ALT Enzyme Mix	1.5 μ l
ALT Substrate Mix	15 μ l
ALT Probe	30 μ l
1X ALT Assay Buffer	103.5 μ l

- * 150 μ l/well 기준으로 Positive control, Sample과 Standard well 수를 고려하되 총 소요량보다 약 10% 많은 Reaction mix를 준비합니다.
(사용 전 Spin-down)

- ⑤ Reaction mix를 Standard, Positive control, Sample well에 150 μ l씩 분주합니다.
- ⑥ ALT CoEnzyme solution을 아래와 같이 만들어 준비합니다.

Kit components (Colorimetric)	Reaction mix (25 μ l/well)
ALT CoEnzyme	2.5 μ l
D.W.	22.5 μ l

- * 25 μ l/well 기준으로 Positive control, Sample과 Standard well 수를 고려하되 총 소요량보다 약 10% 많은 Reaction mix를 준비합니다.
(사용 전 Spin-down)

- ⑦ ALT CoEnzyme solution을 Standard, Positive control, Sample well에 25 μ l씩 분주합니다.
- ⑧ 즉시 Kinetic mode로 1 h ~ 2 h 동안 (37 $^{\circ}$ C) Microplate reader로 흡광도 450 nm에서 측정합니다.

결과 분석

ALT 1 mU은 37°C에서 min 당 1.0 nmole의 Glutamate를 생성하는 효소의 양입니다.

- 각 Standard well과 Sample well의 Duplicate 또는 Triplicate 측정값의 평균값을 구합니다.
- 모든 측정값에서 Blank 값을 뺍니다.
- T1, T2 두 시간대에 OD1, OD2를 선택합니다. (T2 > T1 > 10 min)
이때, T1, T2 은 1 min 이상 차이ना야 하며, OD2 은 OD1 보다 커야 합니다
- T2 시간대에 Standard 흡광도 값으로 Standard curve를 그립니다.
- OD1과 OD2 사이의 Sample 흡광도 값의 변화(ΔA)를 계산합니다. (ΔA=OD2-OD1)
- 각 Sample의 ΔA를 Standard curve에 대입하여 분석 내에서 생성된 Glutamate의 양을 결정합니다.
이때, 모든 Sample의 OD1, OD2, ΔA 값은 Standard curve 내의 값이어야 합니다.
- 아래 방정식을 사용하여 Sample 내에 ALT Activity를 결정합니다.

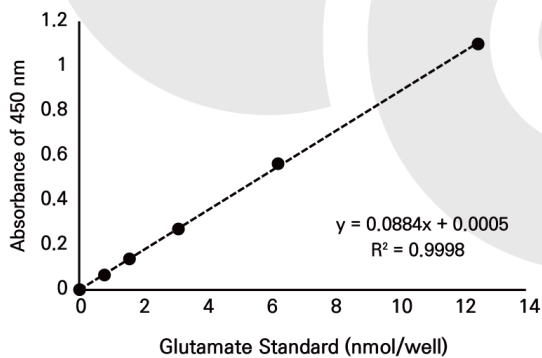
$$ALT\ Activity(mU/ml) = \frac{B}{\Delta T \times 0.05ml} \times D$$

B : Sample 의 ΔA 를 Standard curve 에 대입하여 분석 내에서 생성된 Glutamate 의 양 (nmol/well)

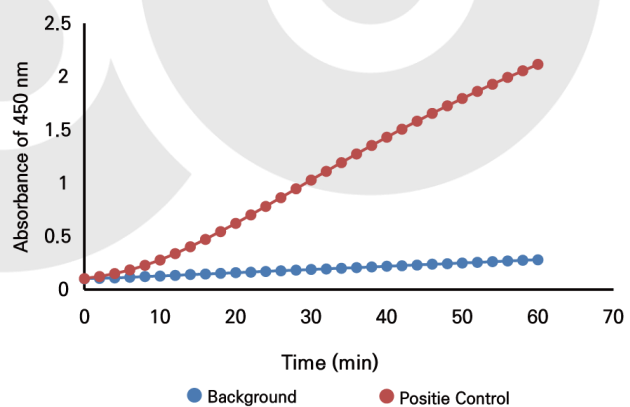
ΔT : 선택한 T2 와 T1 사이의 시간 변화량 (ΔT = T2 - T1, min)

0.05 ml : 첨가한 Sample volume

D : Sample 희석 배율



Glutamate Standard Curve (0-12.5 nmol)



Kinetic activity curve using ALT positive control

Related products

- BM-AST-100

PicoSens™ AST Assay Kit (Colorimetric)

- BM-ALK-500

PicoSens™ Alkaline Phosphatase Activity Assay Kit (Colorimetric)

*** 안전한 사용을 위해 유해물질 정보는 MSDS를 참조하십시오.**



Homepage : www.biomax.com

Shopping mall : www.biomaxmall.com

E-mail : info@scgbiomax.com

Tel : 02-3296-3158 / Fax : 02-973-2858

(주) 바이오맥스 : 경기 구리시 갈매순환로166번길 46, 금강펜테리움 IX타워 CORE-C, 7층

Note