

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0409

Size: 100T/96S

酰基转移酶 (AAT) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

AAT 是一个多功能蛋白大家族,主要负责催化生物体内各种酰基化和去酰基化反应,在基因表达、代谢和信号传导中具有重要作用。

二、测定原理:

AAT 催化乙酰 CoA 转移乙酰基到丁醇,释放的 CoA 还原 DTNB 生成 TNB; TNB 在 412nm 有吸收峰,测定 412nm 吸光度增加速率可计算 AAT 活性。

三、需自备的仪器和用品:

研钵、冰、台式离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、恒温水浴锅。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 100 mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 15 mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉剂×1 管	-20℃保存	临用前加蒸馏水 1mL 充分溶解, 4℃保存
试剂四	液体 2 mL×1 管	4℃保存	
试剂五	粉剂×1 管	4℃避光保存	临用前加入试剂二 1mL 充分溶解, 4℃避光保存。

五、粗酶液提取：

1. 组织：按照组织质量(g)：试剂一体积(mL)为 1: 5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一）进行冰浴匀浆。12000g，4℃离心 20min，取上清置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量(10⁴个)：试剂一体积(mL)为 500~1000: 1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；然后 12000g，4℃，离心 20min，取上清置于冰上待测。
3. 液体：直接检测。

六、AAT 测定操作：

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min，调节波长到 412nm，蒸馏水调零。
2. 试剂二在 37℃水浴保温 30min 以上。
3. 空白管：依次在 1mL 玻璃比色皿中依次加入 20μL 蒸馏水、140μL 预热的试剂二、10μL 试剂三、20μL 试剂四和 10μL 试剂五，迅速混匀后于 412nm 比色，记录 10 s 和 130 s 的吸光值，分别记为 A 和 A₂。ΔA_空=A₂-A₁。空白管只需做 1 个。
4. 测定管：依次在 1mL 玻璃比色皿中依次加入 20μL 上清液、140μL 预热的试剂二、10μL 试剂三、20μL 试剂四和 10μL 试剂五，迅速混匀后于 412nm 比色，记录 10 s 和 130 s 的吸光值，分别记为 A₃ 和 A₄。ΔA_测=A₄-A₃。如果ΔA_测偏低，可以延长反应时间，如测定 10 s 和 310 s 的吸光度，相应修改计算公式中反应时间。

七、AAT 活性计算：

● 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1) 按照蛋白浓度计算

活性单位定义：37℃中每毫克蛋白每分钟催化吸光值变化 0.001 个单为 1U。

$$\text{AAT (U/mg prot)} = 1000 \times (\Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空}}) \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T$$

$$= 5000 \times (\Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空}}) \div \text{Cpr}$$

(2) 按照样本质量计算

活性单位定义：37°C中每克组织每分钟催化吸光值变化 0.001 个单为 1U。

$$\text{AAT (U/g)} = 1000 \times (\Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空}}) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T =$$

$$5000 \times (\Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空}}) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：37°C中每 10⁴个细胞每分钟催化吸光值变化 0.001 个单为 1U。

$$\text{AAT (U/10}^4 \text{ cell)} = 1000 \times (\Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空}}) \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 5000 \times (\Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空}}) \div \text{细胞数量}$$

Cpr: 上清液蛋白浓度, mg/mL, 蛋白质浓度需要另外测定; V 样: 加入反应体系中上清液体积, 0.1mL; W: 样本质量, g; V 样: 加入反应体系中上清液体积, 0.1mL; V 样总: 提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 2 min。

● 使用 96 孔板测定的计算公式如下

(1) 按照蛋白浓度计算

活性单位定义：37°C中每毫克蛋白每分钟催化吸光值变化 0.001 个单位为 1U。

$$\text{AAT (U/mg prot)} = 1000 \times (\Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空}}) \times V_{\text{总}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T$$

$$= 5000 \times (\Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空}}) \div \text{Cpr}$$

(2) 按照样本质量计算

活性单位定义：37°C中每克组织每分钟催化吸光值变化 0.001 个单位为 1U。

$$\text{AAT (U/g)} = 1000 \times (\Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空}}) \times V_{\text{总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T$$

$$= 5000 \times (\Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空}}) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：37°C 中每 10^4 个细胞每分钟催化吸光值变化 0.001 个单位为 1U。

$$\text{AAT (U/10}^4 \text{ cell)} = 1000 \times (\Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空}}) \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 5000 \times (\Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空}}) \div \text{细胞数量}$$

Cpr: 上清液蛋白浓度, mg/mL, 蛋白质浓度需要另外测定; V 样: 加入反应体系中上清液体积, 0.02mL; V 总: 反应总体积, 0.2 mL; W: 样品质量, g; V 样总: 提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 15min。Cpr: 上清液蛋白浓度, mg/mL, 蛋白质浓度需要另外测定; V 样: 加入反应体系中上清液体积, 0.02mL; V 总: 反应总体积, 0.2 mL; W: 样品质量, g; V 样总: 提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 2min。

八、注意事项:

1. 上清液蛋白质含量需要另外测定。建议使用本公司 BCA 蛋白法含量检测试剂盒(ZC-S0470)。
2. 配制好后未使用完的试剂 4°C 保存, 3 天内使用完毕。