

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-S0686

Size: 25T/24S

酰基转移酶 (AAT) 检测试剂盒说明书

可见分光光度法

*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:

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

三、需自备的仪器和用品:

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

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
提取液	液体 25 mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 25 mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	粉剂×1 支	-20°C 保存	临用前加蒸馏水 1.5 mL 充分溶解, 4°C 保存
试剂三	液体 2.5 mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂四	粉剂×1 瓶	4°C 避光保存	临用前加入试剂一 1.3mL 充分溶解, 4°C 避光保存

四、操作步骤：

● 样本的前处理：

组织样品：称取约 0.1g 样品，加提取液 1mL，冰上充分研磨，15000g 4℃离心 20min，取上清液待测。

血清（浆）：直接检测。

● 测定步骤：

1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 412nm，蒸馏水调零。

2、试剂一在 37℃水浴保温 30 min 以上。

3、样本测定

试剂名称 (μL)	空白管	测定管
蒸馏水	100	-
上清液	-	100
试剂一（预热）	700	700
试剂二	50	50
试剂三	100	100
试剂四	50	50

将上述试剂按顺序加入 1mL 玻璃比色皿中，加试剂四的同时开始计时，在 412nm 波长下记录 10s 时的初始吸光度 A1 和 130s 后的吸光值 A2，计算 $\Delta A_{\text{空}} = A2_{\text{空}} - A1_{\text{空}}$ ； $\Delta A_{\text{测}} = A2_{\text{测}} - A1_{\text{测}}$ ， $\Delta A = \Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空}}$ 。

注：如果 $\Delta A_{\text{测}}$ 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。

五、AAT 活性计算：

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：37°C中每mL反应体系下每毫克蛋白每分钟催化吸光值变化0.001个单位为1U。

$$\text{AAT (U/mg prot)} = 1000 \times \Delta A \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T = 5000 \times \Delta A \div \text{Cpr};$$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：37°C中每mL反应体系下每克组织每分钟催化吸光值变化0.001个单位为1U。

$$\text{AAT (U/g 鲜重)} = 1000 \times \Delta A \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T = 5000 \times \Delta A \div W$$

(3) 按血清（浆）体积计算：

单位的定义：37°C中每mL反应体系下每mL血清（浆）每分钟催化吸光值变化0.001个单位为1U。

$$\text{AAT (U/mL)} = 1000 \times \Delta A \div V \text{ 样} \div T = 5000 \times \Delta A。$$

Cpr: 上清液蛋白浓度, mg/mL; V 样: 加入反应体系中上清液体积, 0.1mL; W: 样品质量, g; V 样总: 提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 2min。

六、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 蛋白质含量测定试剂盒（货号：ZC-S0470）
2. 当吸光值大于1时，建议稀释后测量。