

上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

酰基转移酶 (alcohol acyl transferase , AAT) 活性测定试剂盒 微量法

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

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。

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。

自备仪器和用品：

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。

试剂组成和配制：

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。

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。

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 A1 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。

AAT 活性计算:

a. 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°C中每毫克蛋白每分钟催化吸光值变化 0.001 个单为1U。

$$\begin{aligned} \text{AAT (U/mg prot)} &= 1000 \times (\Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空}}) \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 5000 \times (\Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空}}) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{AAT (U/g)} &= 1000 \times (\Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空}}) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 5000 \times (\Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空}}) \div W \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{AAT (U/10}^4 \text{ cell)} &= 1000 \times (\Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空}}) \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 5000 \times (\Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空}}) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

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。

b. 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。

$$\begin{aligned} \text{AAT (U/mg prot)} &= 1000 \times (\Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空}}) \times V_{\text{总}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 5000 \times (\Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空}}) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{AAT (U/g)} &= 1000 \times (\Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空}}) \times V_{\text{总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 5000 \times (\Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空}}) \div W \end{aligned}$$

(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个单位为1U。

$$\begin{aligned} \text{AAT (U/10}^4 \text{ cell)} &= 1000 \times (\Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空}}) \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 5000 \times (\Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空}}) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

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。

注意事项:

1. 上清液蛋白质含量需要另外测定。建议购买本公司生产的 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。
2. 配制好后未使用完的试剂 4°C保存, 3 天内使用完毕。