

酰基转移酶 (alcohol acyl transferase, AAT) 活性测定试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

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 412 nm 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、无水乙醇。

试剂组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：液体 20mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：粉剂×1 瓶，-20℃ 保存。

试剂三：粉剂×1 支，4℃ 避光保存。

粗酶液提取：

1. 组织：按照组织质量 (g)：提取液体积 (mL) 为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液）进行冰浴匀浆。8000g，4℃ 离心 10min，取上清置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量 (10⁴ 个)：提取液体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液），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 8000g，4℃，离心 10min，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 412 nm，蒸馏水调零。
- 2、工作液的配制：临用前在试剂二瓶中加入 18mL 试剂一，充分混匀待用。用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融。
- 3、试剂三的配制：临用前加无水乙醇 1mL 充分溶解待用，用不完的试剂 4℃ 保存。
- 4、空白管：在 Ep 管或 96 孔板中加入 10μL 提取液和 180μL 工作液，充分混匀，35℃ 反应 15min，加入 10μL 试剂三，充分混匀，25℃ 静置 10min，测定 412nm 处吸光值，记为 A 空白管。
- 5、测定管：在 Ep 管或 96 孔板中加入 10μL 样本和 180μL 工作液，充分混匀，35℃ 反应 15min，加入 10μL 试剂三，充分混匀，25℃ 静置 10min，测定 412nm 处吸光值，记为 A 测定管。 $\Delta A = A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}$ ，空白管只要做一管。

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：每毫克蛋白每分钟催化产生 1nmol TNB 定义为一个酶活单位。

$AAT \text{ (nmol/min/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times C_{pr}) \div T = 98.04 \times \Delta A \div C_{pr}$

(2) 按照样本质量计算

活性单位定义：每克组织每分钟催化产生 1nmol TNB 定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{AAT (nmol/min /g 鲜重)} &= \Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 98.04 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：每 10^4 个细胞每分钟催化产生 1nmol TNB 定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{AAT (nmol/min/10}^4\text{cell)} &= \Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 98.04 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：每毫升样品每分钟催化产生 1nmol TNB 定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{AAT (nmol/min/mL)} &= \Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div V \text{ 样} \div T \\ &= 98.04 \times \Delta A \end{aligned}$$

ε : TNB 消光系数, 13600L/mol/cm; d: 比色皿光径: 1cm; V 反总: 反应总体积, 0.2mL;
V 样: 加入反应体系中上清液体积, 0.01mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 蛋白含量, mg/mL; W: 样本质量, g; T: 反应时间, 15 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：每毫克蛋白每分钟催化产生 1nmol TNB 定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{AAT (nmol/min/mg prot)} &= \Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 196.08 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按照样本质量计算

活性单位定义：每克组织每分钟催化产生 1nmol TNB 定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{AAT (nmol/min /g 鲜重)} &= \Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 196.08 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：每 10^4 个细胞每分钟催化产生 1nmol TNB 定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{AAT (nmol/min/10}^4\text{cell)} &= \Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 196.08 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：每毫升样品每分钟催化产生 1nmol TNB 定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{AAT (nmol/min/mL)} &= \Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div V \text{ 样} \div T \\ &= 196.08 \times \Delta A \end{aligned}$$

ε : TNB 消光系数, 13600L/mol/cm; d: 96 孔板光径: 0.5cm; V 反总: 反应总体积, 0.2mL;
V 样: 加入反应体系中上清液体积, 0.01mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 蛋白含量, mg/mL; W: 样本质量, g; T: 反应时间, 15min。