

酰基转移酶（AAT）活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC2350

规格：10T/9S、25T/24S、50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	10T 规格	25T 规格	50T 规格	保存条件
提取液	液体 15 mL×1 瓶	液体 30 mL×1 瓶	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 10 mL×1 瓶	液体 25 mL×1 瓶	液体 50 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 支	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂三	液体 1.5 mL×1 支	液体 3 mL×1 瓶	液体 6 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 1mL×1 支	液体 1.5mL×1 支	液体 3mL×1 瓶	2-8℃保存

10T 溶液的配制：

- 1、提取液：内含不溶物，使用前摇匀；
- 2、试剂二：临用前加蒸馏水 1mL 充分溶解，未用完的试剂 2-8℃可以保存 2 周；

25T、50T 溶液的配制：

- 1、提取液：内含不溶物，使用前摇匀。
- 2、试剂二：临用前取一支试剂二加 1.5 mL 蒸馏水充分溶解，未用完的试剂 2-8℃可以保存 2 周。

产品说明：

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。

AAT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。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。

需自备的仪器和用品：

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

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1、组织样本：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。4℃，15000 g 离心 20min，取上清液待测。

2、血清（浆）样本：直接检测。（若液体有浑浊则离心后进行测定）

二、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°C水浴保温20min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，充分吹打混匀，在412nm波长下记录第10s时的初始吸光度A1和130s后的吸光值A2，计算 $\Delta A_{\text{空}} = A2_{\text{空}} - A1_{\text{空}}$ 、 $\Delta A_{\text{测}} = A2_{\text{测}} - A1_{\text{测}}$ 、 $\Delta A = \Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空}}$ 。空白只需做1-2次。

三、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1个酶活单位。

$$\text{AAT (U/mg prot)} = \Delta A \div 0.001 \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 5000 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

2、按样本质量计算

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1个酶活单位。

$$\text{AAT (U/g 质量)} = \Delta A \div 0.001 \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 5000 \times \Delta A \div W$$

3、按血清体积计算

单位的定义：37°C中每mL反应体系下每mL血清每分钟催化吸光值变化0.001个单位为1个酶活单位。

$$\text{AAT (U/mL 血清)} = \Delta A \div 0.001 \div V_{\text{样}} \div T = 5000 \times \Delta A$$

Cpr: 上清液蛋白浓度, mg/mL, 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样总: 提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 2min。

注意事项:

- 1、当吸光值大于1时，建议稀释后测量。
- 2、如果 $\Delta A_{\text{测}}$ 小于0.01，可以延长反应时间，如测定10s和310s的吸光度，计算时相应修改计算公式中反应时间。

实验实例:

- 1、取0.1g肾脏加入1mL提取液进行样本处理，取上清后稀释4倍后按测定步骤操作，测得 $\Delta A_{\text{空}} = A2_{\text{空}} - A1_{\text{空}} = 0.105 - 0.101 = 0.004$ 、 $\Delta A_{\text{测}} = A2_{\text{测}} - A1_{\text{测}} = 0.665 - 0.479 = 0.186$ 、 $\Delta A = \Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空}} = 0.186 - 0.004 = 0.182$ ，按样本质量计算酶活得：

$$\text{AAT (U/g 质量)} = 5000 \times \Delta A \div W \times 4 \text{ (稀释倍数)} = 36400 \text{ U/g 质量}。$$

- 2、取兔血清直接按照测定步骤操作，测得 $\Delta A_{\text{空}} = A2_{\text{空}} - A1_{\text{空}} = 0.105 - 0.101 = 0.004$ 、 $\Delta A_{\text{测}} = A2_{\text{测}} - A1_{\text{测}} = 0.622 - 0.521 = 0.101$ 、 $\Delta A = \Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空}} = 0.101 - 0.004 = 0.097$ ，按血清体积计算酶活得：

$$\text{AAT (U/mL 血清)} = 5000 \times \Delta A = 5000 \times 0.097 = 485 \text{ U/mL 血清}。$$

相关发表文献

- [1] Zhang W, Fan X, Li J, Ye T, Mishra S, Zhang L, Chen S. Exploration of the Quorum-Quenching Mechanism



in *Pseudomonas nitroreducens* W-7 and Its Potential to Attenuate the Virulence of *Dickeya zeae* EC1. *Front Microbiol.* 2021 Aug 3;12:694161. doi: 10.3389/fmicb.2021.694161. PMID: 34413838; PMCID: PMC8369503.

- [2] Guo S, Zhao X, Ma Y, Wang Y, Wang D. Fingerprints and changes analysis of volatile compounds in fresh-cut yam during yellowing process by using HS-GC-IMS. *Food Chem.* 2022 Feb 1;369:130939. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.130939. Epub 2021 Aug 25. PMID: 34469843.

相关系列产品:

- BC0590/BC0595 游离脂肪酸 (FFA) 含量检测试剂盒
BC1080/BC1085 乙醇脱氢酶 (ADH) 活性检测试剂盒
BC0320/BC0325 植物中脂氧合酶 (LOX) 活性检测试剂盒

