

**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°C保存；

试剂一：液体20mL×1瓶，4°C保存；

试剂二：粉剂×1瓶，-20°C保存。

试剂三：粉剂×1支，4°C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°C离心10min，取上清置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量（10<sup>4</sup>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°C，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°C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°C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°C反应15min，加入10μL试剂三，充分混匀，25°C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°C反应15min，加入10μL试剂三，充分混匀，25°C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。

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

(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。

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

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：每104个细胞每分钟催化产生1nmol TNB定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{AAT (nmol/min/104cell)} &= \Delta A \div (\square \times d) \times V_{\text{反总}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 98.04 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(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。

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

$\square$ ：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。

$$\begin{aligned} \text{AAT (nmol/min/mg prot)} &= \Delta A \div (\square \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 196.08 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(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。

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

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：每104个细胞每分钟催化产生1nmol TNB定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{AAT (nmol/min/104cell)} &= \Delta A \div (\square \times d) \times V_{\text{反总}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 196.08 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(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。

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

$\square$ ：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。

---

[www.affandi-e.com](http://www.affandi-e.com)