



## 酰基转移酶（AAT）活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

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	25T	50T	保存条件
提取液	液体 10 mL×1 瓶	液体 30 mL×1 瓶	液体 50 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 瓶	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂三	液体 1 mL×1 支	液体 3 mL×1 瓶	液体 5 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	粉剂×1 支	液体 1.5 mL×1 瓶	粉剂×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 0.6 mL 充分溶解，2-8℃保存；
- 3、试剂四：临用前加入试剂一 0.6 mL 充分溶解，2-8℃避光保存。

25T 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入 1.5 mL 蒸馏水充分溶解，未用完的试剂 2-8℃可以保存 2 周。

50T 溶液的配制：

- 1、提取液：内含不溶物，使用前摇匀。
- 2、试剂二：临用前加蒸馏水 2.6 mL 充分溶解，2-8℃保存。
- 3、试剂四：临用前加入试剂一 2.6 mL 充分溶解，2-8℃保存。

**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。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

**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/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）

组织样本：称取约 0.1g 样本，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）样本：直接检测。

## 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，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 $\Delta A_{空}=A2_{空}-A1_{空}$ 、 $\Delta A_{测}=A2_{测}-A1_{测}$ 、 $\Delta A=\Delta A_{测}-\Delta A_{空}$ 。

## 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。

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

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。

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

### 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。

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

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: 样本质量, g; V样总: 提取液体积, 1mL; 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。
- 2、当吸光值大于1时，建议稀释后测量。
- 3、如果 $\Delta A_{测}$ 偏低，可以延长反应时间，如测定10s和310s的吸光度，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 $\Delta A_{空}=A2_{空}-A1_{空}=0.105-0.101=0.004$ 、 $\Delta A_{测}=A2_{测}-A1_{测}=0.665-0.479=0.186$ 、 $\Delta A=\Delta A_{测}-\Delta A_{空}=0.186-0.004=0.182$ ，按样本质量计算酶活得：

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

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

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

**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