



酰基转移酶（AAT）活性检测试剂盒说明书

微量法

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：BC2355

规格：100T/96S

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	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂三	液体 3 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 1.5 mL×1 支	2-8℃保存

溶液的配制：

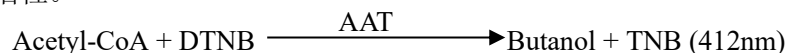
1、提取液：内含不溶物，使用前摇匀。

2、试剂二：临用前取一支试剂二加 1 mL 蒸馏水充分溶解，未用完的试剂 2-8℃可以保存 2 周。（为了延长使用时间，因此多给一支试剂二）

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412 nm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/酶标仪、台式离心机、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、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/酶标仪预热30min 以上，调节波长至412nm，蒸馏水调零。

2、试剂一在37℃水浴保温20 min以上。

3、 样本测定：

试剂名称 (μL)	空白管	测定管
蒸馏水	20	-
上清液/血清	-	20
试剂一 (预热)	140	140
试剂二	10	10
试剂三	20	20
试剂四	10	10

将上述试剂按顺序加入微量石英比色皿/96孔板中，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 $\Delta A_{空} = A2_{空} - A1_{空}$ ； $\Delta A_{测} = A2_{测} - A1_{测}$ ， $\Delta A = \Delta A_{测} - \Delta A_{空}$ 。空白管只需做1-2次。

三、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。

$$AAT (U/mg \text{ prot}) = \Delta A \div 0.001 \div (Cpr \times V_{样}) \div T \times (V_{反总} \div 1) = 5000 \times \Delta A \div Cpr$$

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。

$$AAT (U/g \text{ 质量}) = \Delta A \div 0.001 \div (V_{样} \div V_{样总} \times W) \div T \times (V_{反总} \div 1) = 5000 \times \Delta A \div W$$

3、按血清浓度计算

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。

$$AAT (U/mL \text{ 血清}) = \Delta A \div 0.001 \div V_{样} \div T \times (V_{反总} \div 1) = 5000 \times \Delta A$$

Cpr: 上清液蛋白浓度, mg/mL, 需自行测定; V样: 加入反应体系中上清液体积, 0.02mL; W: 样本质量, g; V样总: 提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 2min; V反总: 反应总体积, 0.2mL; 1: 每mL反应体系。

B、使用96孔板测定的计算公式如下：

1、按蛋白浓度计算

AAT活力单位定义：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0.0005个单位为1U。

$$AAT (U/mg \text{ prot}) = \Delta A \div 0.0005 \div (Cpr \times V_{样}) \div T \times (V_{反总} \div 1) = 10000 \times \Delta A \div Cpr$$

2、按样本质量计算

AAT活力单位定义：37°C中每mL反应体系下每克组织每分钟催化吸光值变化0.0005个单位为1U。

$$AAT (U/g \text{ 质量}) = \Delta A \div 0.0005 \div (V_{样} \div V_{样总} \times W) \div T \times (V_{反总} \div 1) = 10000 \times \Delta A \div W$$

3、按血清浓度计算

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0.0005个单位为1U。

$$AAT (U/mL \text{ 血清}) = \Delta A \div 0.0005 \div V_{样} \div T \times (V_{反总} \div 1) = 10000 \times \Delta A$$

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; W: 样本质量, g; V样总: 提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 2min; V反总: 反应总体积, 0.2mL; 1: 每mL反应体系。

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、 建议一个一个样本测定，一人比色一人计时。
- 4、 如果 ΔA 测小于0.01，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。

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，用微量石英比色皿测得 $\Delta A_{空} = A_{2空} - A_{1空} = 0.0849 - 0.08 = 0.0049$ 、 $\Delta A_{测} = A_{2测} - A_{1测} = 0.69 - 0.4929 = 0.1971$ 、 $\Delta A = \Delta A_{测} - \Delta A_{空} = 0.1971 - 0.0049 = 0.1922$ ，按样本质量计算酶活得：

$AAT (U/g \text{ 质量}) = 5000 \times \Delta A \div W \times 4$ （稀释倍数）=38440 U/g 质量。

- 2、 取兔血清直接按照测定步骤操作，测得 $\Delta A_{空} = A_{2空} - A_{1空} = 0.0849 - 0.08 = 0.0049$ 、 $\Delta A_{测} = A_{2测} - A_{1测} = 0.629 - 0.5342 = 0.0948$ 、 $\Delta A = \Delta A_{测} - \Delta A_{空} = 0.0948 - 0.0049 = 0.0899$ ，按血清体积计算酶活得：

$AAT (U/mL \text{ 血清}) = 5000 \times \Delta A = 5000 \times 0.0899 = 449.5 U/mL \text{ 血清}$ 。

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