

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

分光光度法

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

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。

组成：

产品名称	FA005-25T/24S	FA005-50T/48S	Storage
提取液：液体	25ml	50ml	4°C
试剂一：液体	25ml	50ml	4°C
试剂二：粉剂	1 瓶	1 瓶	-20°C
试剂三：粉剂	1 支	1 瓶	4°C避光
说明书		一份	

自备仪器和用品：

研钵、冰、台式离心机、可见分光光度计、1ml 玻璃比色皿、恒温水浴锅、无水乙醇。

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（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°C，离心 10min，取上清置于冰上待测。
3. 液体：直接检测。

FA005-25T/24S-AAT 测定操作：

- 1、分光光度计预热 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 22.5mL 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 1.25mL 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 **50μl 提取液**和 900μL 工作液，充分混匀，35℃反应 15min，加入 50μL 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 **50μl 样本**和 900μL 工作液，充分混匀，35℃反应 15min，加入 50μL 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。

FA005-50T/48S-AAT 测定操作：

1、分光光度计预热 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 45ml 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 2.5ml 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 **50μl 提取液**和 900μl 工作液，充分混匀，35℃反应 15min，加入 50μl 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 **50μl 样本**和 900μl 工作液，充分混匀，35℃反应 15min，加入 50μl 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 活性计算公式：

(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。

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

(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。

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

(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。

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

(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。

$$\text{AAT (nmol/min /ml)} = \Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 98.04 \times \Delta A$$

ε ：TNB 消光系数，13600L/mol/cm； $V_{\text{反总}}$ ：反应总体积，1ml； $V_{\text{样}}$ ：加入反应体系中上清液体积，0.05ml； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1ml； C_{pr} ：蛋白含量，mg/ml； W ：样本质量，g； T ：反应时间，15 min。

