

## 酰基转移酶（AAT）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：AC10431

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，有疑问请及时联系本公司工作人员。**

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 100 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 15 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×1 支	-20°C保存
试剂三	液体 2 mL×1 瓶	4°C保存
试剂四	粉剂×1 支	4°C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：临用前加蒸馏水 1 mL 充分溶解，4°C保存。
- 3、试剂四：临用前加入试剂一 1 mL 充分溶解，4°C避光保存。

### 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、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）

组织样本：称取约 0.1g 样本加提取液 1mL，冰上充分研磨，15000g 4°C离心 20min，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/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°C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 $\Delta A_{空} = A2_{空} - A1_{空}$ ； $\Delta A_{测} = A2_{测} - A1_{测}$ ， $\Delta A = \Delta A_{测} - \Delta A_{空}$ 。

### 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; 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。

#### 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 $\Delta A$ 测偏低， 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 $\Delta A_{\text{空}} = A_{2\text{空}} - A_{1\text{空}} = 0.0849 - 0.08 = 0.0049$ 、  $\Delta A_{\text{测}} = A_{2\text{测}} - A_{1\text{测}} = 0.69 - 0.4929 = 0.1971$ 、  $\Delta A = \Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空}} = 0.1971 - 0.0049 = 0.1922$ ， 按样本质量计算酶活得：  
 $AAT (\text{U/g 质量}) = 5000 \times \Delta A \div W \times 4$ （稀释倍数） $= 38440 \text{ U/g 质量}$ 。
- 2、 取兔血清直接按照测定步骤操作， 测得 $\Delta A_{\text{空}} = A_{2\text{空}} - A_{1\text{空}} = 0.0849 - 0.08 = 0.0049$ 、  $\Delta A_{\text{测}} = A_{2\text{测}} - A_{1\text{测}} = 0.629 - 0.5342 = 0.0948$ 、  $\Delta A = \Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空}} = 0.0948 - 0.0049 = 0.0899$ ， 按血清体积计算酶活得：  
 $AAT (\text{U/mL 血清}) = 5000 \times \Delta A = 5000 \times 0.0899 = 449.5 \text{ U/mL 血清}$ 。