

## 酰基转移酶（AAT）检测试剂盒（微量法）

**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。

### 试剂组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：液体 20mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：粉剂×1 瓶，-20℃ 保存。

试剂三：粉剂×1 支，4℃ 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℃ 离心 10min，取上清置冰上待测。
- 2. 细菌、真菌：**按照细胞数量（ $10^4$  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℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。
- 3. 液体：**直接检测。

### AAT 测定步骤：

- 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℃ 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℃ 保存。
- 4、**空白管：**在 Ep 管或 96 孔板中加入 **10 $\mu$ L 提取液**和 180 $\mu$ L 工作液，充分混匀，35℃ 反应 15min，加入 10 $\mu$ L 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 **10 $\mu$ L 样本**和 180 $\mu$ L 工作液，充分混匀，35℃ 反应 15min，加入 10 $\mu$ L 试剂三，充分混匀，25℃ 静置 10min，测定 412nm 处吸光值，记为 A 测定管。 $\Delta A = A$  测定管 - A 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。

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

(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。

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

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：每 10<sup>4</sup> 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。

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

$\varepsilon$ ：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。

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

(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。

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

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟催化产生 1nmol TNB 定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{AAT (nmol/min/10}^4\text{cell)} &= \Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 196.08 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(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。

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

$\varepsilon$ ：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。