

酰基转移酶(AAT)活性检测试剂盒说明书

(货号: ADS-F-FM009-09 分光法 9 样)

有效期: 3 个月

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, 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。

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、可调式移液枪和蒸馏水。

试剂组成和配制:

试剂一: 液体 10ml×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二: 液体 10ml×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂三: 粉剂 1ml×1 瓶, -20℃ 保存。临用前加蒸馏水 0.6 mL 充分溶解。

试剂四: 液体×1 瓶, 4℃ 避光保存。

试剂五: 粉剂×1 瓶, 4℃ 避光保存。临用前加试剂二 0.6 mL 充分溶解。

粗酶液提取:

1. 组织: 按照组织质量 (g): 试剂一体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 试剂一) 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): 试剂一体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一), 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 测定操作:

1. 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长到 412 nm, 蒸馏水调零。
2. 试剂二在 37℃ 水浴保温 30 min 以上。
3. 空白管: 依次在 1mL 玻璃比色皿中依次加入 100 μ L 蒸馏水、700 μ L 预热的试剂二、50 μ L 试剂三、100 μ L 试剂四, 35℃ 水浴 15min, 加 50 μ L 试剂五, 室温放置 10min 后于 412nm 测定吸光度, 记为 A1。
4. 测定管: 依次在 1mL 玻璃比色皿中依次加入 100 μ L 上清液、700 μ L 预热的试剂二、50 μ L 试剂三、100 μ L 试剂四 35℃ 水浴 15min, 加 50 μ L 试剂五, 室温放置 10min 后于 412nm 测定吸光度, 记为 A2。 $\Delta A = A2 - A1$

AAT 活性计算:

(1) 按蛋白浓度计算

AAT 活力单位定义: 每毫克蛋白每分钟催化吸光值变化 0.001 个单位为 1U。

$$\begin{aligned} \text{AAT (U/mg prot)} &= 1000 \times \Delta A_{\text{测}} \times V_{\text{总}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 666.7 \times \Delta A_{\text{测}} \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算

AAT 活力单位定义: 每克组织每分钟催化吸光值变化 0.001 个单位为 1U。

$$\begin{aligned} \text{AAT (U/g 鲜重)} &= 1000 \times \Delta A_{\text{测}} \times V_{\text{总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 666.7 \times \Delta A_{\text{测}} \div W \end{aligned}$$

(3) 按液体体积计算

AAT 活力单位定义：每毫升样本每分钟催化吸光值变化 0.001 个单位为 1U。

$$\begin{aligned} \text{AAT (U/mg prot)} &= 1000 \times \Delta A_{\text{测}} \times V_{\text{总}} \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 666.7 \times \Delta A_{\text{测}} \end{aligned}$$

(4) 按细菌、细胞数量计算

AAT 活力单位定义：每 10^4 个细菌、细胞每分钟催化吸光值变化 0.001 个单位为 1U。

$$\begin{aligned} \text{AAT (U/g 鲜重)} &= 1000 \times \Delta A_{\text{测}} \times V_{\text{总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \div T \\ &= 666.7 \times \Delta A_{\text{测}} \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

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; V 总: 反应总体积, 1 mL; W : 样品质量; V 样总: 提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 15min。