

醇酰基转移酶 (alcohol O-acetyltransferase, AAT) 活性说明书

(货号: ADS-W-AAT001 微板法 48 样)

一、产品简介:

醇酰基转移酶 (AAT, EC 2.3.1.84) 是酯类化合物生物合成过程中的关键酶, 研究表明该酶活性与果实中酯类化合物的含量呈正相关。

醇酰基转移酶 (AAT) 催化乙酰 CoA 和醇类化合物生成酯类化合物和 CoA, 生成的 CoA 具有还原性并可与 DTNB 作用生成黄色物质, 该有色物质在 412nm 处有特征吸收峰, 即可得出 MS 酶活性大小。

反应式: $\text{acetyl-CoA} + \text{a primary alcohol} = \text{CoA} + \text{an acetyl ester}$ 。

二、试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 6mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 1 支	4℃保存	临用前取出 40μL 的试剂二至新 EP 管中, 再加入 1.1mL 蒸馏水混匀备用。
试剂三	液体 1mL×1 支	4℃保存	若凝固, 可于 25℃水浴片刻至全部融解后使用。
试剂四	液体 0.5mL×1 支	4℃保存	
标准品	粉剂 1 支	4℃保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水

四、醇酰基转移酶 (AAT) 活性测定:

1、样本制备:

- ① 组织样本: 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm 4℃离心 15min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例提取

- ② 细菌/细胞样本: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm 4℃离心 15min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

- ③ 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

- ① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 412nm。
- ② 所有试剂解冻至室温 (25℃), 在 96 孔板中依次加入:

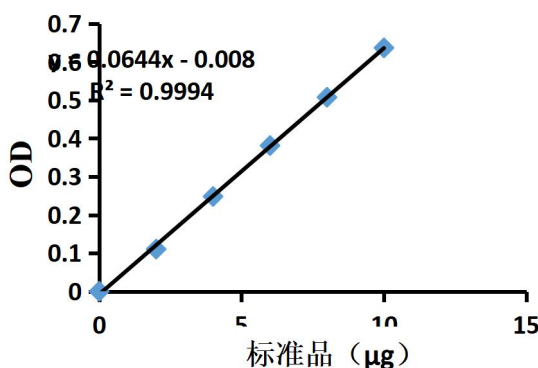
试剂名称 (μL)	测定管
样本	50
试剂一	100
试剂二	20
试剂三	20
混匀, 30℃条件下孵育 10min, 立即于 412nm 处读取吸光值 A1,	
试剂四	10
混匀, 30℃条件下反应 30min, 立即于	

412nm 处读取吸光值 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。

【注】：若 ΔA 过小，可以延长反应时间 T（如：30℃条件下孵育 60min 或更长），或增加样本量 V1（如增至 100μL，则试剂一相应减少）。调整后的 T 或 V1 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.0644x - 0.008$ ，x 是标准品质量：μg，y 是 ΔA 。



2、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1nmol 辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$AAT(nmol/min/mg \text{ prot}) = [(\Delta A + 0.008) \div 0.0644] \div (V1 \times Cpr) \div T \div Mr \times 10^3 = 13.5 \times (\Delta A + 0.008) \div Cpr$$

3、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟催化产生 1nmol 辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$AAT(nmol/min/g \text{ 鲜重}) = [(\Delta A + 0.008) \div 0.0644] \div (W \times V1 \div V) \div T \div Mr \times 10^3 = 13.5 \times (\Delta A + 0.008) \div W$$

4、按细菌或细胞密度计算：

酶活定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 1 nmol 辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$AAT(nmol/min/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.008) \div 0.0644] \div (500 \times V1 \div V) \div T \div Mr \times 10^3 = 0.027 \times (\Delta A + 0.008)$$

5、按照液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体样本每分钟催化产生 1 nmol 辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$AAT(nmol/min/mL) = [(\Delta A + 0.008) \div 0.0644] \div V1 \div T \div Mr \times 10^3 = 13.5 \times (\Delta A + 0.008)$$

V1---加入样本体积，0.05mL； V---加入提取液体积，1mL； T---反应时间，30min；

W---样本质量，g； CoA---Mr 分子量，767.5； 500---细胞或细菌总数，万；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL； 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（1mg/mL）：用 1mL 蒸馏水溶解标准品（母液需在两天内用且 -20℃ 保存）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.2 mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据以下步骤操作，50μL 标准品+130μL 试剂一+20μL 试剂三，根据结果即可制作标准曲线。