

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 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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：acetyl-CoA+a primary alcohol=CoA+an acetyl ester。

二、试剂盒组成和配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
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	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 取出 40 μ L 的试剂二至新 EP 管中，再加入 1.1mL 蒸馏水混匀备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 1mL×1 支	4℃避光保存	1. 若凝固，可于 25℃水浴片刻至全部融解后使用； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	液体 0.5mL×1 支	4℃避光保存	
标准品	粉剂 1 支	-20℃避光保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

1、样本提取：

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（10⁴）：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、检测步骤:

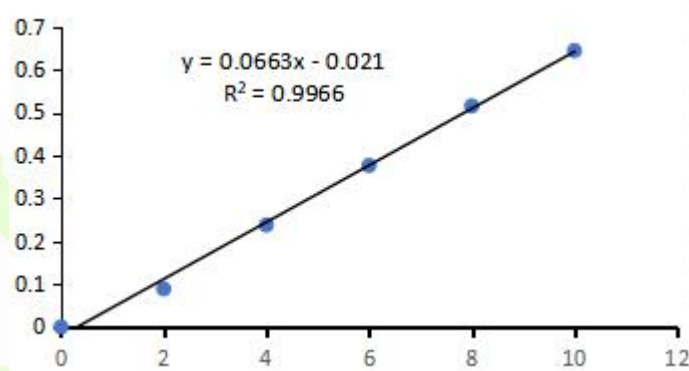
- ① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 412nm。
- ② 所有试剂解冻至室温 (25°C), 在 96 孔板中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管
样本	50
试剂一	100
试剂二	20
试剂三	20
混匀, 30°C 条件下孵育 10min, 立即于 412nm 处读取吸光值 A1,	
试剂四	10
混匀, 30°C 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°C 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: $y = 0.0663x - 0.021$, 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。

$$AAT(nmol/min/mg \text{ prot}) = [(\Delta A + 0.008) \div 0.0644] \div (V1 \times Cpr) \div T \div Mr \times 10^3 = 13.1 \times (\Delta A + 0.021) \div Cpr$$

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。

$$AAT(nmol/min/g \text{ 鲜重}) = [(\Delta A + 0.008) \div 0.0644] \div (W \times V1 \div V) \div T \div Mr \times 10^3 = 13.1 \times (\Delta A + 0.021) \div W$$

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。

$$AAT(nmol/min/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.008) \div 0.0644] \div (500 \times V1 \div V) \div T \div Mr \times 10^3 = 0.027 \times (\Delta A + 0.021)$$

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。

$$AAT(nmol/min/mL) = [(\Delta A + 0.008) \div 0.0644] \div V1 \div T \div Mr \times 10^3 = 13.1 \times (\Delta A + 0.021)$$

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 用 1mL 蒸馏水溶解标准品 (母液需在两天内用且 -20°C 保存), 标准品母液浓度为 1mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.2 mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

- 2 标品稀释参照表如下:

吸取标准品母液 200uL, 加入 800uL 蒸馏水, 混匀得到 0.2mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	0.04	0.08	0.12	0.16	0.2
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据以下加样表操作, 根据结果, 以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值, 过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	50	
蒸馏水		50
试剂一	130	130
试剂三	20	20
于 412nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		