

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

(货号: G0926F 分光法 24 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 30mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 13mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	液体 mL×1 支	4°C 保存	临用前取出 70μL 的试剂二至新 EP 管中, 再加入 1.2mL 蒸馏水混匀备用。
试剂三	液体 1mL×1 支	4°C 保存	若凝固, 可于 25°C 水浴片刻至全部融解后使用。
试剂四	粉剂 mg×1 支	4°C 保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加入 0.6mL 蒸馏水溶解, 可分装保存, 尽量避免反复冻融。
标准品	粉剂 mg×1 支	4°C 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、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:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品和实验流程, 避免样本和试剂浪费!

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°C 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°C 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 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 412nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C), 在 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中依次加入:

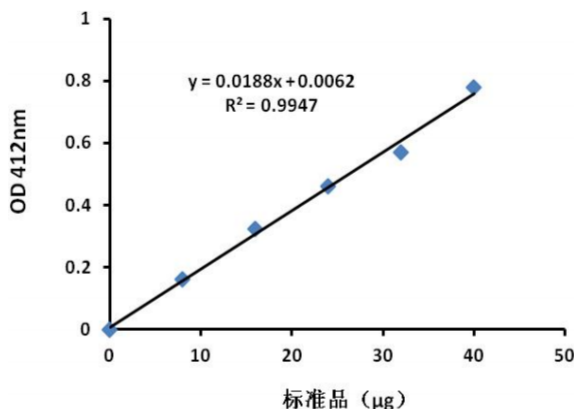
试剂名称 (μL)	测定管
样本	200
试剂一	500
试剂二	40
试剂三	40
混匀, 30°C 条件下孵育 10min, 立即于 412nm 处读取吸光值 A1,	
试剂四	20

混匀，30℃条件下反应 15min，立即于 412nm 处读取吸光值 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。

【注】：若 ΔA 小于 0.01，可以延长反应时间 T（如：30℃条件下孵育 30min 或更长），或增加样本量 V1（如增至 400μL，则试剂一相应减少），或增加取样质量 W。调整后的 T 或 V1 和 W 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.0188x + 0.0062$ ，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。

$$\text{AAT}(\text{nmol/min/mg prot}) = [(\Delta A - 0.0062) \div 0.0188] \div (V1 \times Cpr) \div T \div Mr \times 10^3 = 23.1 \times (\Delta A - 0.0062) \div Cpr$$

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。

$$\text{AAT}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [(\Delta A - 0.0062) \div 0.0188] \div (W \times V1 \div V) \div T \div Mr \times 10^3 = 23.1 \times (\Delta A - 0.0062) \div W$$

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。

$$\text{AAT}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A - 0.0062) \div 0.0188] \div (500 \times V1 \div V) \div T \div Mr \times 10^3 = 0.046 \times (\Delta A - 0.0062)$$

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。

$$\text{AAT}(\text{nmol/min/mL}) = [(\Delta A - 0.0062) \div 0.0188] \div V1 \div T \div Mr \times 10^3 = 23.1 \times (\Delta A - 0.0062)$$

V1---加入样本体积，0.2mL； V---加入提取液体积，1mL； T---反应时间，15min；
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(2mg/mL)：用 0.5mL 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，200μL 标准品+560μL 试剂一+40μL 试剂三，根据结果即可制作标准曲线。