

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

（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 mL×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 mg×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（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、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：

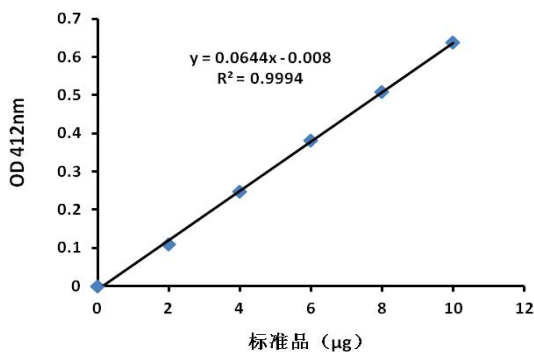
试剂名称（μL）	测定管
样本	50
试剂一	100
试剂二	20
试剂三	20
混匀，30℃条件下孵育 10min，立即于 412nm 处读取吸光值 A1，	
试剂四	10
混匀，30℃条件下反应 30min，立即于	

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°C条件下孵育 60min 或更长), 或增加样本量 V1 (如增至 100 μ L, 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: μ g, 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。

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

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。

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

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。

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

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。

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

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°C 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, 50 μ L 标准品+130 μ L 试剂一+20 μ L 试剂三, 根据结果即可制作标准曲线。