天净沙系列

CAT#:EC2.6.1.11

低温运输和保存

乙酰鸟氨酸转氨酶活性测定试剂盒（比色法）

Acetylornithine Transaminase Assay Kit

使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品用于测定乙酰鸟氨酸转氨酶（Acetylornithine Transaminase，EC2.6.1.11）活性，其原理是在乙酰鸟氨酸转氨酶催化下 N-乙酰-L-鸟氨酸与α-酮戊二酸发生反应，α-酮戊二酸在反应中被消耗，而α-酮戊二酸可与 2,4-二硝基苯肼（DNPH）反应生成棕红色腙衍生物，该衍生物在 540 nm 有特征光吸收，因此可以通过检测吸光值下降的量间接测定乙酰鸟氨酸转氨酶的活性。本产品有如下特点：

1. 即开即用，使用便捷，用户不需要优化条件，只需准备待测样本。
2. 最低检测限为 0.18 U，线性范围在 0.25 U-0.71 U 之间。
3. 本试剂盒 1 个酶活性单位的定义是在 37℃ pH 8.0 的条件下，每分钟能催化 1 μmol 底物转化所需的酶量。由于一次催化反应消耗一分子的α-酮戊二酸，故 1 个酶活性单位相当于在 37℃ pH 8.0 的条件下每分钟催化 1 μmol α-酮戊二酸分解所需的酶量。
4. 本产品足够 100 次 1 mL 体系的比色皿检测或 400 次 250 μL 体系的 96 孔板检测。
5. 本产品只可用于科研。

规格及成分

本产品使用塑料袋包装

成份	编号	规格	包装
乙酰鸟氨酸转氨酶活性测定底物干粉	EC2.6.1.11s	100 T	60 mL 本色瓶
乙酰鸟氨酸转氨酶活性测定显色液	EC2.6.1.11c	50 mL	50 mL 棕色瓶
乙酰鸟氨酸转氨酶活性测定反应液	EC2.6.1.11r	50 mL	60 mL 本色瓶
α-酮戊二酸干粉	CAS:328-50-7	100 T	1.5 mL 本色管
使用手册	EC2.6.1.11sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，2-8℃保存，有效期一年。

自备物品

待测样本、1.5 M 氢氧化钠溶液、样本缓冲液、分光光度计、1 mL 比色皿

使用方法

一、首次使用本试剂盒时配制下列溶液

1. 配制乙酰鸟氨酸转氨酶活性测定底物液：将 40 mL 乙酰鸟氨酸转氨酶活性测定反应液加入到装有乙酰鸟氨酸转氨酶活性测定底物干粉的瓶中，颠倒摇晃 20 次溶解，得乙酰鸟氨酸转氨酶活性测定底物液。
2. 配制 1 mM α-酮戊二酸溶液：将 1 mL 乙酰鸟氨酸转氨酶活性测定反应液加入到装有α-酮戊二酸干粉的瓶中，颠倒摇晃 20 次溶解，得 1 mM α

-酮戊二酸溶液。

二、待测样本的制备

3. 用自选方式制备待测样本，样本溶于缓冲液中，缓冲液 pH 值控制为 8.0。注意：由于 Cu^{2+}、Zn^{2+}等金属离子会严重抑制乙酰鸟氨酸转氨酶活性而 Mg^{2+}、Mn^{2+}等离子会促进乙酰鸟氨酸转氨酶活性，故样本中不得含有这些物质。同时，由于本试剂盒测定的是α-酮戊二酸，故样本中也不得有α-酮戊二酸的成分。
4. 预留 10 mL 最后溶解样本的样本溶解液，作为后续测光吸收时的阴性对照。
5. 用自备试剂测定待测样本的蛋白浓度，以备后续计算比活时使用。

三、标准曲线梯度稀释液的制备

6. 每次测量都应制作标准曲线，下面以 6 个稀释度的标准曲线为例。
7. 标记 1-6 个 1.5 mL 离心管，每个管中加入 0.7 mL 超纯水。
8. 将第 2 步制备的 1 mM α-酮戊二酸溶液为 1 号管样品。
9. 2 号管中加入 0.7 mL 在第 2 步制备的 1 mM α-酮戊二酸溶液，充分震荡 1 分钟，得 0.5 mM α-酮戊二酸溶液。放冰上待用。
10. 换枪头，在 3 号管中加入 0.7 mL 0.5 mM α-酮戊二酸溶液（上步稀释所得），充分震荡 1 分钟，得 250 μM α-酮戊二酸溶液。放冰上待用。
11. 重复上面的操作直到得到 1 mM、0.5 mM、250 μM、125 μM、62.5 μM、31.25 μM 共 6 个稀释度的样品。放冰上待用。

四、用光径 1 cm 的比色皿测定光吸收

12. 标记 N+7 个 1.5 mL 的塑料离心管，其中 N 个用于待测样品，1 个用于阴性对照，6 个用于标曲。
13. 按下表加入各成分：

成分	N 个样本管	阴性对照	6 个标曲管
自备样本溶解液	各 80 μL	100 μL	100 μL
N 个自备待测样本	各 20 μL	不加	不加
乙酰鸟氨酸转氨酶活性测定底物液	各 500 μL	500 μL	不加
各梯度的α-酮戊二酸溶液	不加	不加	各 500 μL
混合均匀 37℃保温 30 min			
乙酰鸟氨酸转氨酶活性测定显色液	各 200 μL	200 μL	各 200 μL

混合均匀室温静置 10 min			
自备 1.5 M 氢氧化钠溶液	各 200 μL	200 μL	各 200 μL
总体积	1 mL	1 mL	1 mL
混合均匀室温静置 5 min			

14. 冷却到室温后迅速用分光光度计在 540 nm 测定 OD，测前用蒸馏水调零。

五、数据分析

15. 计算真实 OD540 光吸收：每个样本测得的光吸收减去阴性对照的光吸收即为每个样本的光吸收。共 N+6 个读数。
16. 制备标准曲线：以α-酮戊二酸溶液的浓度为横轴，以其真实 OD540 光吸收为纵轴，绘制标准曲线。
17. 根据计算公式，用 N 个样本的 OD540 数据计算出其所对应的α-酮戊二酸浓度。根据乙酰鸟氨酸转氨酶活性的定义（每分钟降解 1 μmol α-酮戊二酸所需要的酶量为 1 个单位）计算出酶的活性。
18. 计算样本的酶比活性：样本总体积乘以酶浓度 U/mL 即得样本总酶单位数 U，样本总体积乘以其蛋白浓度即得样本总蛋白量（以 mg 为单位），样本酶比活（U/mg）=总酶单位数/总蛋白量。

六、96 孔板检测

19. 操作同上，只是在设置反应时，各成份的用量降低 75%，只用 25%。同时光径不是 1 cm，要根据所用 96 孔板修改（需要咨询厂家）。

关联产品	天门冬氨酸转氨酶活性测定试剂盒