

支链氨基酸转氨酶 (Branched-chain amino acid aminotransferase, BCAT)

试剂盒说明书

(货号: BP10385W 微板法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

支链氨基酸转氨酶(BCAT, E.C.2.6.1.42) 属于以磷酸吡哆醛作为辅酶的IV类转氨酶。该酶分布十分广泛, 已经发现广泛存在于原核生物和大多数真核生物中。

支链氨基酸转氨酶(BCAT)催化特异 L-型氨基酸氨基转移到 α -酮戊二酸, 形成相应的支链 α -酮酸和谷氨酸; 再用特异作用于谷氨酸的酶复合体分解谷氨酸, 同时与显色剂反应生成黄色物质, 该物质在 450nm 处有最大吸收峰, 进而得到支链氨基酸转氨酶(BCAT)的酶活性大小。

该酶催化反应: L-leucine + 2-oxoglutarate = 4-methyl-2-oxopentanoate + L-glutamate。

二、试剂盒的组成和配制:

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°C保存	
试剂一	粉剂 1 瓶	4°C保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 2.2mL 的蒸馏水充分溶解, 仍 4°C保存。
试剂二	粉剂 1 支	4°C保存	3. 临用前 8000g 4° C 离心 2mim 使试剂落入管底(可手动甩一甩); 4. 加入 1.2mL 蒸馏水溶解备用, 仍 4°C保存。
试剂三	粉剂 1 支	-20°C保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2mim 使试剂落入管底(可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用, 仍-20°C保存。
试剂四	液体 20mL×1 瓶	4°C保存	
试剂五	液体 2mL×1 支	4°C保存	
试剂六	粉剂 1 支	-20°C保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2mim 使试剂落入管底(可手动甩一甩); 2. 再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用, 仍-20°C保存。
试剂七	液体 1mL×1 支	4°C避光保存	
标准品	液体 1 支	4°C保存	

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:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

- ① 组织样本: 称取约 0.1g 组织(水分多的样本取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4°C离心 10min, 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 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, 300W, 超声 3s, 间隔 7s, 总时间 3min); 12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

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

2、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min 以上,调节波长至 450nm。

② 在 EP 管中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
试剂一	20	20
试剂二	20	
试剂三	10	10
试剂四	150	170
样本	100	100
混匀, 37℃反应 60min (准确时间), 立即于 95℃沸水中水浴 2min 后, 上下振动几下混匀后, 12000rpm 室温离心 5 分钟, 上清液待测。		

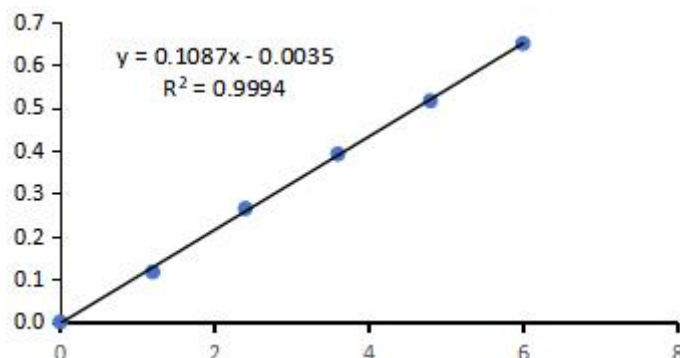
③ 显色反应: 在 96 孔板中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
提取液	100	100
试剂五	20	20
试剂六	10	10
试剂七	10	10
上清液	60	60
混匀, 30℃反应 15min, 立即于 450nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。 (每个样本需设一个自身对照)		

【注】若 ΔA 差值在零附近徘徊,可以在显色反应阶段增加上清液 (V3) 的量 (如增加到 120μL), 则提取液相应减少, 改变后的 V3 重新代入公式计算; 或延长第②步中 30℃反应时间 T (如由 60min 增加至 90min), 则改变后的反应时间 T 需代入计算公式重新计算。。

五、结果计算:

1、标准曲线方程为 $y = 0.1087x - 0.0035$, x 为谷氨酸摩尔质量 (nmol), y 为 ΔA 。



2、按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每毫克组织蛋白每小时生成 1 nmol 的谷氨酸定义为一个酶活力单位。

$BCAT \text{ (nmol/h/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0035) \div 0.1087] \times (V2 \div V3) \div (V1 \times Cpr) \div T$

$$=460 \times (\Delta A + 0.0035) \div C_{pr}$$

3、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每小时生成 1 nmol 的谷氨酸定义为一个酶活力单位。

$$BCAT \text{ (nmol/h/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0035) \div 0.1087] \times (V_2 \div V_3) \div (W \times V_1 \div V) \div T$$

$$=460 \times (\Delta A + 0.0035) \div W$$

4、按细菌或细胞密度计算：

单位定义：每百万细菌或细胞每小时生成 1 nmol 的谷氨酸定义为一个酶活力单位。

$$BCAT \text{ (nmol/h/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0035) \div 0.1087] \times (V_2 \div V_3) \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.92 \times (\Delta A + 0.0035)$$

V---提取液体积，1 mL； V1---加入样本体积，0.1 mL； V2---反应总体积，0.3mL；

V3---显色阶段上清液体积，0.06mL； T---反应时间，60min=1h； W---样本质量，g；

500---细胞数量，百万； Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司 BCA 蛋白含量测定试剂盒；

附：标准曲线制作过程：

1 标准品母液浓度为 10nmol/μL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1. nmol/μL。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：

1. 吸取标准品母液 100uL，加入 900uL 蒸馏水，混匀得到 1nmol/μL 的标品稀释液；						
2. 吸取 1nmol/μL 的标品稀释液 100uL，加入 900uL 蒸馏水，混匀得到 0.1 nmol/μL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 nmol/μL	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1
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 依据显色反应阶段测定管的加样表操作，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)
提取液	100	100
试剂五	20	20
试剂六	10	10
试剂七	10	10
标品	60	
蒸馏水		60
混匀，30℃反应 15min，立即于 450nm 处读取吸光值 A， △A=A 测定-0 浓度管。		