

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

试剂盒说明书

(货号: G0443F 分光法 24 样)

一、产品简介:

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: $L\text{-leucine} + 2\text{-oxoglutarate} = 4\text{-methyl-2-oxopentanoate} + L\text{-glutamate}$ 。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 55mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	4°C保存	用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部, 再加 2.2mL 的蒸馏水充分溶解, 仍 4°C保存。
试剂二	粉剂 mg×1 支	4°C保存	用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部, 再加 1.2mL 蒸馏水溶解备用。仍 4°C保存。
试剂三	粉剂 mg×1 支	4°C保存	用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部, 再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。仍 4°C保存。
试剂四	液体 15mL×1 瓶	4°C保存	
试剂五	液体 4mL×1 支	4°C保存	
试剂六	粉剂 mg×1 支	-20°C保存	用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部, 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保存	
标准品	液体 mL×1 支	4°C保存	

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)、水浴锅、可调式移液器、研钵和蒸馏水。

四、支链氨基酸转氨酶(BCAT)活性检测:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

- 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°C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、上机检测:

- ① 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 450nm, 蒸馏水调零。
② 所有试剂解冻至室温 (25°C), 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μ L)	测定管	对照管
试剂一	40	40

试剂二	40	
试剂三	20	20
试剂四	200	240
样本	150	150
混匀, 37°C反应 60min (准确时间), 立即于 95°C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。		

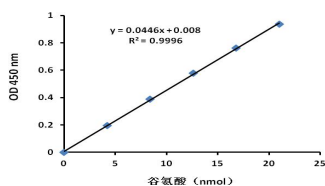
③ 显色反应: 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
提取液	370	370
试剂五	80	80
试剂六	20	20
试剂七	20	20
上清液	210	210
混匀, 30°C反应 15min, 液体全部转移至 1mL 玻璃比色皿(光径 1cm) 中, 立即于 450nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{测定} - A_{对照}$ (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 300μL, 则提取液相应减少), 则改变后的 V3 重新代入公式计算; 或延长第②步中 30°C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 $y = 0.0446x + 0.008$; 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。

$$\text{BCAT (nmol/h/mg prot)} = [(\Delta A - 0.008) \div 0.0446] \times (V2 \div V3) \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 320.3 \times (\Delta A - 0.008) \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{BCAT (nmol/h/g 鲜重)} = [(\Delta A - 0.008) \div 0.0446] \times (V2 \div V3) \div (W \times V1 \div V) \div T = 320.3 \times (\Delta A - 0.008) \div W$$

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。

$$\text{BCAT (nmol/h/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A - 0.008) \div 0.0446] \times (V2 \div V3) \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.64 \times (\Delta A - 0.008)$$

V--提取液体积, 1 mL; V1--加入样本体积, 0.15mL; V2--反应总体积, 0.45mL;

V3--显色阶段上清液体积, 0.21mL; 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 (10nmol/μL)。
- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品: 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1. nmol/μL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据显色反应阶段, 测定管的加样表操作, 根据结果即可制作标准曲线。