



支链氨基酸转氨酶(BCAT)活性测定试剂盒

可见分光光度法

货号: R43919-24S

有效期: 3个月

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-leucine+2-oxoglutarate=4-methyl-2-oxopentanoate+L-glutamate。

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℃保存	
试剂一	粉剂mg×1支	4℃保存	用前甩几下或4℃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℃保存。
试剂二	粉剂mg×1支	4℃保存	用前甩几下或4℃离心使试剂落入试管底部, 再加1.2mL蒸馏水溶解备用。仍4℃保存。
试剂三	粉剂mg×1支	4℃保存	用前甩几下或4℃离心使试剂落入试管底部, 再加1.1mL蒸馏水溶解备用。仍4℃保存。
试剂四	液体15mL×1瓶	4℃保存	
试剂五	液体4mL×1支	4℃保存	
试剂六	粉剂mg×1支	-20℃保存	用前甩几下或4℃离心使试剂落入试管底部, 再加1.1mL蒸馏水溶解备用。仍-20℃保存。
试剂七	液体1mL×1支	4℃保存	
标准品	液体mL×1支	4℃保存	



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。

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(水分多的样本取0.5g),加入 1mL 提取液,进行冰浴匀浆。12000rpm,4℃ 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。

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450nm,蒸馏水调零。

②所有试剂解冻至室温(25℃),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℃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。



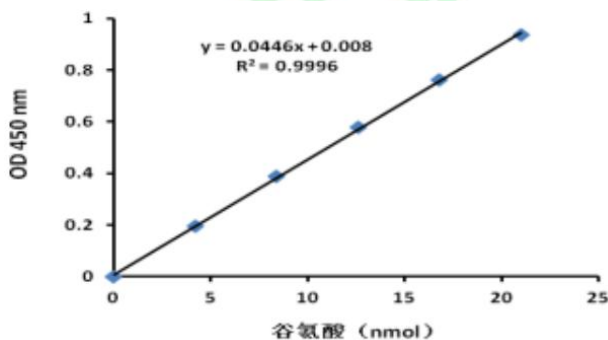
③显色反应：在EP管中依次加入：

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℃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, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本需设一个自身对照)。

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1nmol 的谷氨酸定义为一个酶活力单位。

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

3、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每小时生成1nmol 的谷氨酸定义为一个酶活力单位。

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

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。

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

5、按照液体体积计算:

单位定义: 每毫升液体每小时生成1nmol 的谷氨酸定义为一个酶活力单位。

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

V--提取液体积, 1mL;

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;

50---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。

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。