

## 支链氨基酸转氨酶(BCAT)活性测定试剂盒（微板法）

产品货号：BA2895

产品规格：48样

### 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 $\alpha$ -酮戊二酸，形成相应的支链 $\alpha$ -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： $\text{L-leucine} + 2\text{-oxoglutarate} = 4\text{-methyl-2-oxopentanoate} + \text{L-glutamate}$ 。

### 试剂盒组分与配制：

| 试剂名称 | 规格        | 保存要求 | 备注                                           |
|------|-----------|------|----------------------------------------------|
| 提取液  | 液体60mL×1瓶 | 2-8℃ |                                              |
| 试剂一  | 粉剂mg×1支   | 2-8℃ | 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2-8℃保存。 |
| 试剂二  | 粉剂mg×1支   | 2-8℃ | 用前甩几下或4℃离心使试剂落入试管底部，再加1.2mL的蒸馏水溶解备用，仍2-8℃保存。 |
| 试剂三  | 粉剂mg×1支   | 2-8℃ | 用前甩几下或4℃离心使试剂落入试管底部，再加1.1mL的蒸馏水溶解备用，仍2-8℃保存。 |
| 试剂四  | 液体20mL×1瓶 | 2-8℃ |                                              |
| 试剂五  | 液体2mL×1瓶  | 2-8℃ |                                              |
| 试剂六  | 粉剂mg×1支   | -20℃ | 用前甩几下或4℃离心使试剂落入试管底部，再加1.1mL的蒸馏水溶解备用，仍-20℃保存。 |
| 试剂七  | 液体1mL×1支  | 2-8℃ |                                              |
| 标准品  | 液体mL×1支   | 2-8℃ |                                              |

### 所需仪器和用品：

酶标仪、96孔板、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

### 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。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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450nm。

② 在EP管中依次加入：

| 试剂名称 (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：

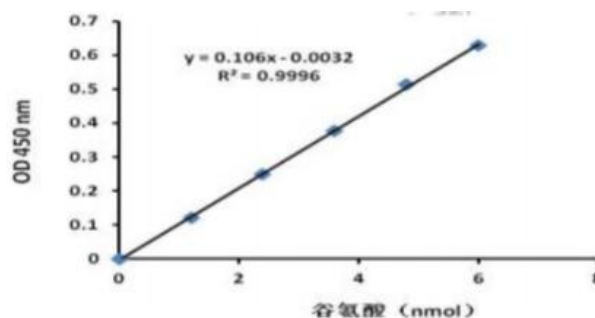
| 试剂名称 (μL) | 测定管 | 对照管 |
|-----------|-----|-----|
| 提取液       | 100 | 100 |
| 试剂五       | 20  | 20  |
| 试剂六       | 10  | 10  |
| 试剂七       | 10  | 10  |
| 上清液       | 60  | 60  |

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 $\Delta A$ 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120 μL，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℃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。

### 结果计算：

1. 标准曲线方程为 $y = 0.106x - 0.0032$ ；x为谷氨酸摩尔质量(nmol)，y为 $\Delta A$ 。



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。

$$\text{BCAT (nmol/h/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0032) \div 0.106] \times (V2 \div V3) \div (V1 \times C_{\text{pr}}) \div T = 471.7 \times (\Delta A + 0.0032) \div C_{\text{pr}}$$

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。

$$\text{BCAT (nmol/h/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0032) \div 0.106] \times (V2 \div V3) \div (W \times V1 \div V) \div T = 471.7 \times (\Delta A + 0.0032) \div W$$



扫一扫 加微信

**上海尚宝生物科技有限公司**

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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1nmol的谷氨酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{BCAT}(\text{nmol/h}/10^4\text{cell})=[(\Delta A+0.0032)\div 0.106]\times(V2\div V3)\div(500\times V1\div V)\div T=0.94\times(\Delta A+0.0032)$$

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。

$$\text{BCAT}(\text{nmol/h/mL})=[(\Delta A+0.0032)\div 0.106]\times(V2\div V3)\div V1\div T=471.7\times(\Delta A+0.0032)$$

V--提取液体积, 1mL; V1--加入样本体积, 0.1mL; 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(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, 0.1nmol/μL。也可根据实际样本来调整浓度。
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。



扫一扫 加微信

**上海尚宝生物科技有限公司**

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>