

磷酸转乙酰酶(PTA)活性测定试剂盒

(微板法 48 样)

产品简介:

磷酸转乙酰酶 (PTA, EC 2.3.1.8) 是与乙酸代谢相关的关键酶之一。

磷酸转乙酰酶 (PTA) 催化辅酶 A 和乙酰磷酸反应生成乙酰辅酶 A 和无机磷, 通过钼酸

铵定磷法测定无机磷的增加量来测定 PTA 酶活性大小。

反应式: $\text{CoA} + \text{acetyl phosphate} \rightleftharpoons \text{acetyl-CoA} + \text{phosphate}$

试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	提取液 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 mg×1 支	4℃保存	用前甩几下使试剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水, 混匀溶解备用。
试剂三	粉体 mg×1 支	-20℃保存	用前甩几下使试剂落入底部, 再加 0.55mL 蒸馏水, 混匀溶解备用。
试剂四	液体 4mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	A:粉体 mg×1 瓶 B:液体 2mL×1 瓶	4℃保存	临用前向 A 中加 1.8mL 的 B 液, 加 23.2mL 的蒸馏水, 混匀溶解备用。
标准品	粉体 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

所需的仪器和用品：

酶标仪、96孔板、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

磷酸转乙酰酶（PTA）活性测定：

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，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm 4℃离心 15min，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 细胞样本：

先收集细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细胞加入 1mL 提取液；超声波破碎细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；4℃ 约 12,000rpm 离心 10min，取上清作为待测样品。

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

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，设置温度 37℃，调节波长至 700nm。

② 试剂放在 37℃水浴 5min，在 EP 管中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
试剂一	180	190
试剂二	10	10
样本	100	100
试剂三	10	
30℃条件下孵育 30min		
试剂四	40	40
混匀，12000rpm，4℃离心 5min，上清液待测。		

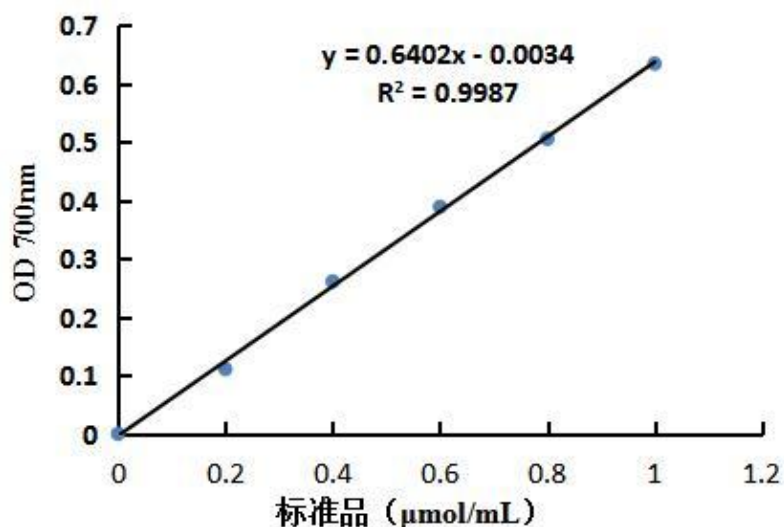
③ 显色反应，在 96 孔板中依次加入：

上清液	50	50
试剂五	200	200
混匀，室温静置 3min，700nm 下读取各管吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本做一个自身对照）。		

【注】：若 ΔA 差值小于 0.01，可增加样本取样质量 W（如增至 0.2g），或增加②步中样本加样体积 V1(如由 100μL 增至 200μL，则试剂一相应减少),或延长②步中 30℃条件下孵育时间 T（如由 30min 延至 60min），则改变后的 W 和 V1 和 T 需代入计算公式重新计算。

结果计算:

1、标准曲线方程： $y = 0.6402x - 0.0034$ ，x 是标准品摩尔质量 (μmol/mL)，y 是 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算：

定义：每小时每毫克组织蛋白催化底物产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{PTA 活力}(\mu\text{mol/h/mgprot}) = [(\Delta A + 0.0034) \div 0.6404 \times V2] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 10.62 \times (\Delta A + 0.0034) \div \text{Cpr}$$

3、按样本鲜重计算：

定义：每小时每克组织催化底物产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{PTA 活力}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0034) \div 0.6404 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T = 10.62 \times (\Delta A + 0.0034) \div W$$

4、按细菌或细胞密度计算：

定义：每小时每 1 万个细菌或细胞催化底物产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{PTA 活力}(\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0034) \div 0.6404 \times V2] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.021 \times (\Delta A + 0.0034)$$

V---加入提取液体积, 1mL; V1---加入样本体积, 0.1mL; V2---②步中酶促反应总体积,
0.34mL;

T---反应时间, 1/2 小时; W---样本鲜重, g; 500---细菌或细胞总数, 500 万;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液 (50 μ mol/mL)：标准品用 1mL 试剂一溶解。(母液需在两天内用)。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. μ mol/mL。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体系操作，根据结果即可制作标准曲线。