

## 磷酸转乙酰酶(Phosphotransacetylase, PTA)活性测定试剂盒

### 分光法 24 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 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉体 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 3mL×1 瓶	4℃保存	临用前加 2.9mL 的 B 液, 再加 37.1mL 的蒸馏水, 混匀溶解备用。

**[注]:** 全程操作需无磷环境; 试剂配置最好用新的枪头和玻璃移液器等, 也可以用一次性塑料器皿, 避免磷污染。

## 所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、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°C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°C 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 可见分光光度计预热 30min 以上，设置温度 37°C，调节波长至 700nm，蒸馏水调零。

② 试剂放在 37°C水浴 5min，在 EP 管中依次加入：

试剂名称（ $\mu\text{L}$ ）	测定管	对照管
样本	260	280

试剂一	20	20
试剂二	150	150
试剂三	20	
30℃条件下孵育 30min。		
试剂四	60	60
混匀，12000rpm，4℃离心 5min，上清液待测。		

③ 显色反应，在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

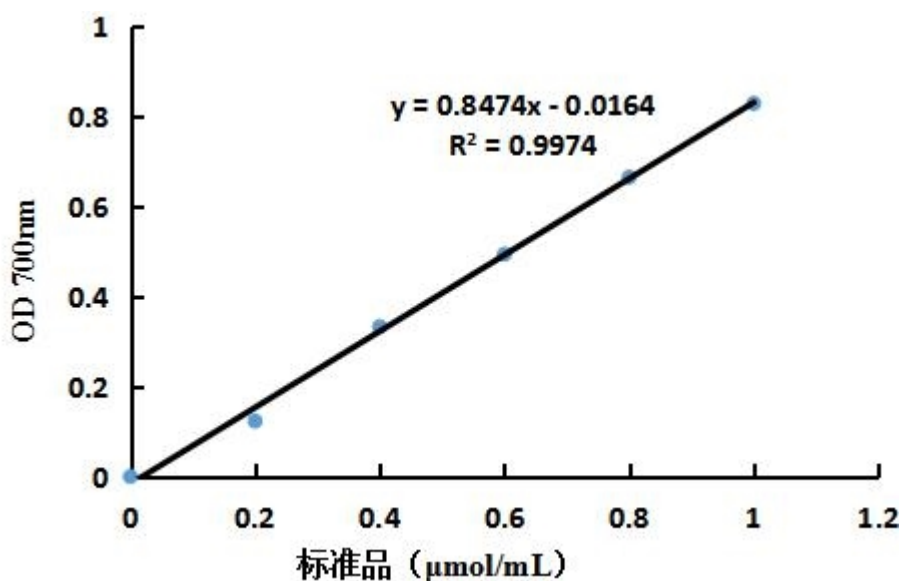
上清液	150	150
试剂五	600	600
混匀，室温静置 3min，700nm 下读取各管吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本做一个自身对照）。		

**[注]**：若 $\Delta A$  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 150 $\mu$ L 增至 300 $\mu$ L，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。

**结果计算：**

**1、标准曲线方程：**

$y = 0.0317x - 0.0095$ ，x 是标准品摩尔质量：nmol，y 是 $\Delta A$ 。



## 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。

$$\text{PTA 活力} (\mu\text{mol/h/mgprot}) = [(\Delta A + 0.0164) \div 0.8474 \times V2] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 8.03 \times (\Delta A + 0.0164) \div \text{Cpr}$$

## 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。PTA 活力(μmol/h/g 鲜重)=[(ΔA+0.0164)÷0.8474×V2]÷(W× V1÷V)÷T=8.03×(ΔA+0.0164)÷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。

$$\text{PTA 活力} (\mu\text{mol/h}/10^4\text{cell}) = [(\Delta A + 0.0164) \div 0.8474 \times V2] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.016 \times (\Delta A + 0.0164)$$

V---加入提取液体积，1mL； V1---加入样本体积，0.15mL； V2---酶促反应总体积，0.51mL；

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 $\mu$ 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.  $\mu$ 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。