

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

(货号: BN72353 微板法 48 样)

### 一、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:  $\text{CoA} + \text{acetyl phosphate} \rightleftharpoons \text{acetyl-CoA} + \text{phosphate}$

### 二、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  | 粉体 mg×1 支                     | 4℃ 保存   | 使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 | 使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<br>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                                |

【注】: 全程操作需无磷环境; 试剂配置用新枪头和玻璃移液器等, 也可用一次性塑料器皿, 避免磷污染。

### 三、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。

### 四、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。 |     |     |

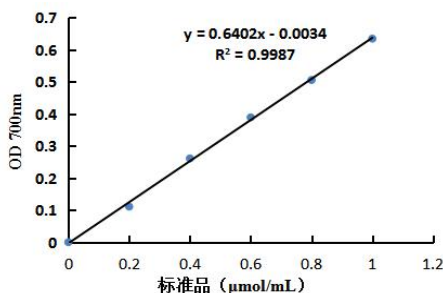
③ 显色反应，在 96 孔板中依次加入：

|                                                                                           |     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 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，<br>$\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （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  $V_1$ （如由 100 $\mu$ L 增至 200 $\mu$ 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  $V_1$  和  $T$  需代入计算公式重新计算。

## 五、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（ $\mu\text{mol/mL}$ ）， $y$  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 1 $\mu\text{mol}$  无机磷的量为一个酶活力单位。

PTA 活力( $\mu\text{mol/h/mgprot}$ )= $[(\Delta A + 0.0034) \div 0.6404 \times V_2] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T = 10.62 \times (\Delta A + 0.0034) \div \text{Cpr}$

3、按样本鲜重计算：

定义：每小时每克组织催化底物产生 1 $\mu\text{mol}$  无机磷的量为一个酶活力单位。

PTA 活力( $\mu\text{mol/h/g 鲜重}$ )= $[(\Delta A + 0.0034) \div 0.6404 \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 10.62 \times (\Delta A + 0.0034) \div W$

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 1 $\mu\text{mol}$  无机磷的量为一个酶活力单位。

PTA 活力( $\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}$ )= $[(\Delta A + 0.0034) \div 0.6404 \times V_2] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.021 \times (\Delta A + 0.0034)$

$V$ ---加入提取液体积，1mL；  $V_1$ ---加入样本体积，0.1mL；  $V_2$ ---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；

$\text{Cpr}$ ---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 $\mu\text{mol/mL}$ ）：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.  $\mu\text{mol/mL}$ 。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。