

Phosphotransacetylase Activity Kit

磷酸转乙酰酶（PTA）活性测定试剂盒说明书

货号:BN72354| 方法: 可见分光法 | 规格: 24 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 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	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 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。
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:

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。

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 可见分光光度计预热 30min 以上, 设置温度 37℃, 调节波长至 700nm, 蒸馏水调零。

② 试剂放在 37℃ 水浴 5min, 在 EP 管中依次加入:

本产品仅用于科研

TEL: 010-82422342 www.biorigin.Ltd

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
试剂一	260	280
试剂二	20	20
样本	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:

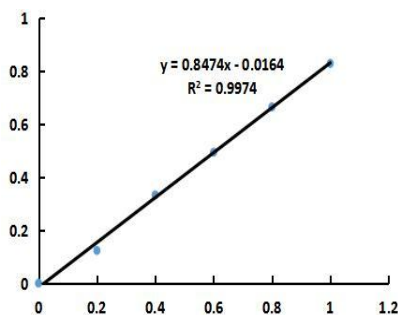
上清液	150	150
试剂五	600	600
混匀, 室温静置 3min, 700nm 下读取各管吸光值, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本做一个自身对照)。		

注意: 本操作流程适用于绝大多数常规样本检测, 实验条件可根据实际样本状态适度微调;

针对特殊类型样本, 我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.8474x - 0.0164$, x 是标准品摩尔质量 ($\mu\text{mol/mL}$), y 是 ΔA 。



标准曲线示意图

说明: 标准曲线由标准品测定获得, 具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持

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。

$$\text{PTA 活力}(\mu\text{mol/h/mgprot}) = [(\Delta A + 0.0164) \div 0.8474 \times V_2] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T = 8.03 \times (\Delta A + 0.0164) \div \text{Cpr}$$

3、按样本鲜重计算:

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

$$\text{PTA 活力}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0164) \div 0.8474 \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 8.03 \times (\Delta A + 0.0164) \div W$$

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。

$$\text{PTA 活力}(\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0164) \div 0.8474 \times V_2] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.016 \times (\Delta A + 0.0164)$$

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。