

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

（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 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。		

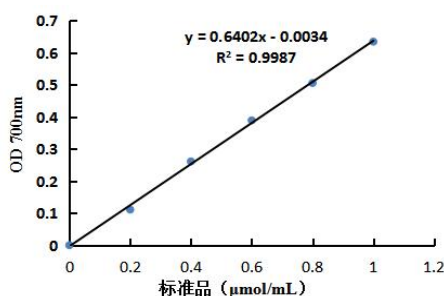
③ 显色反应, 在 96 孔板中依次加入:

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, △A=A 测定-A 对照 (每个样本做一个自身对照)。		

【注】若△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 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。

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 (μmol/mL), y 是△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。

PTA 活力(μmol/h/mgprot)=[(△A+0.0034)÷0.6404×V2] ÷(V1×Cpr)÷T=10.62×(△A+0.0034)÷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)=[(△A+0.0034)÷0.6404×V2]÷(W×V1÷V)÷T=10.62×(△A+0.0034)÷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。

PTA 活力(μmol/h/10⁴ cell)=[(△A+0.0034)÷0.6404×V2]÷(500×V1÷V)÷T=0.021×(△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 (50μmol/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. μmol/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。