



磷酸转乙酰酶(PTA)活性测定试剂盒

可见分光光度法

货号: R45041-24S

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: $\text{CoA} + \text{acetyl phosphate} \rightarrow \text{acetyl-CoA} + \text{phosphate}$

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	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	临用前向A中加2.9mL的B液, 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。

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℃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:

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:

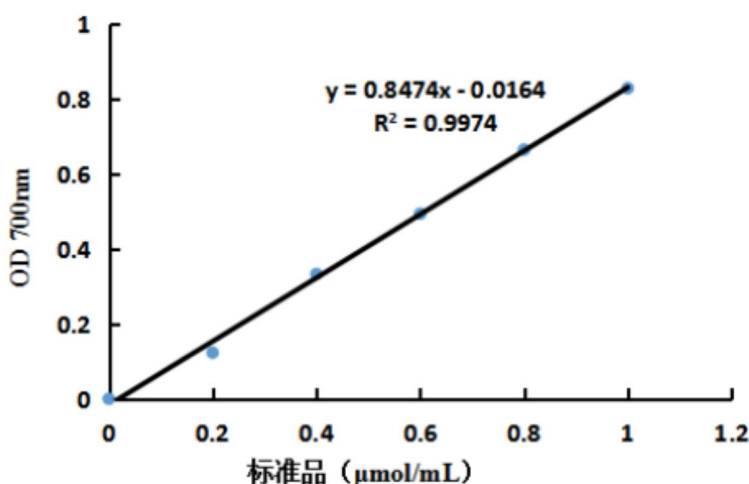
上清液	150	150
-----	-----	-----



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)。		

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 。



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。

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

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。

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

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。

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



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;

50---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。

源叶