

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。 |
| 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 (μL) | 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：

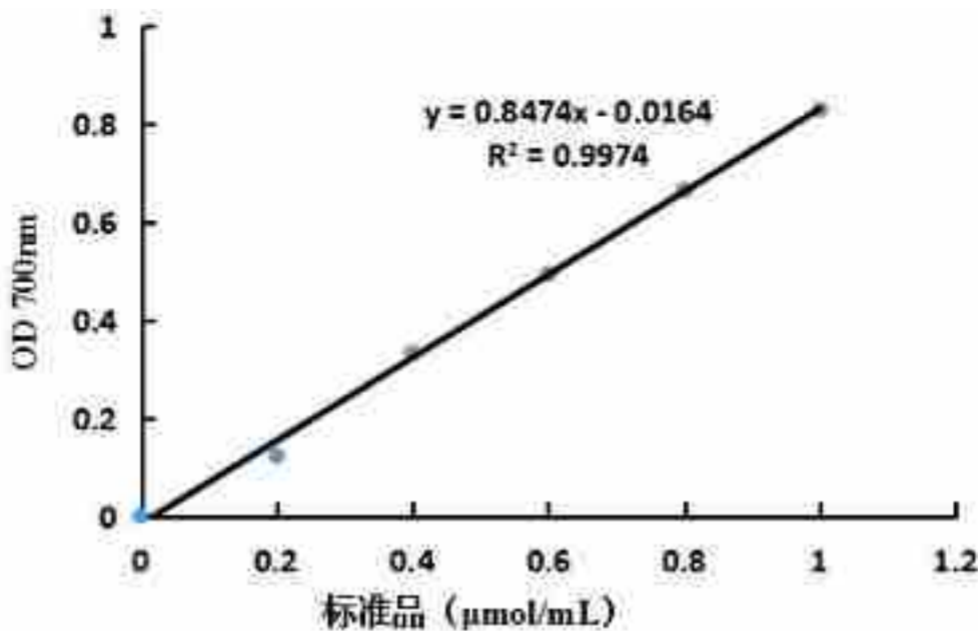
| | | |
|---|-----|-----|
| 上清液 | 150 | 150 |
| 试剂五 | 600 | 600 |
| 混匀，室温静置 3min，700nm 下读取各管吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本做一个自身对照)。 | | |

[注]: 若 ΔA 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 μ L 增至 300 μ 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 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 μ mol 无机磷的量为一个酶活力单位。

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

3、按样本鲜重计算：

定义：每小时每克组织催化底物产生 1 μ mol 无机磷的量为一个酶活力单位。PTA 活力(μ mol/h/g 鲜重)=[($\Delta A + 0.0164$) $\div 0.8474 \times V2$] $\div (W \times V1 \div V) \div T = 8.03 \times (\Delta A + 0.0164) \div W$

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 μ mol 无机磷的量为一个酶活力单位。

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

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 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。

mlbio 酶联生物
Good elisakit producers