

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

（货号：BP10403W 微板法 48 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
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 1 支	-20℃避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 1.1mL 蒸馏水，混匀溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	粉体 1 支	-20℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 0.55mL 蒸馏水，混匀溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	液体 4mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	A:粉体 1 瓶 B:液体 3mL×1 瓶	4℃避光保存	1. 临用前向 A 中加 2.86mL 的 B 液，加 22.14mL 的蒸馏水，混匀溶解备用； 2. 需避光，现配现用，变蓝色不能使用。
标准品	粉体 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

【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、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

- 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 液体样品：澄清的液体样本直接检测，若浑浊则离心后取上清检测。

③ 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、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），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：

试剂组分（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，

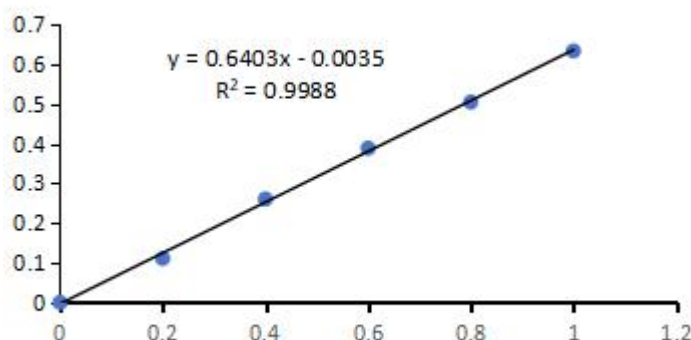
在 96 孔板中依次加入：

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， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （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 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： $y = 0.6403x - 0.0035$ ，x 是标准品摩尔质量（μmol/mL），y 是 ΔA 。



2、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。

$$\text{PTA 活力}(\mu\text{mol/h/g 鲜重})=[(\Delta A+0.0035)\div 0.6403\times V_2]\div (W\times V_1\div V)\div T=10.62\times (\Delta A+0.0035)\div W$$

3、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。

$$\text{PTA 活力}(\mu\text{mol/h/mgprot})=[(\Delta A+0.0035)\div 0.6403\times V_2]\div (V_1\times \text{Cpr})\div T=10.62\times (\Delta A+0.0035)\div \text{Cpr}$$

4、按照液体体积计算：

定义：每小时每毫升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。

$$\text{PTA 活力}(\text{nmol/h/mL})=[(\Delta A+0.0035)\div 0.6403\times V_2]\div V_1\div T=10.62\times (\Delta A+0.0035)$$

5、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。

$$\text{PTA 活力}(\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell})=[(\Delta A+0.0035)\div 0.6403\times V_2]\div (500\times V_1\div V)\div T=0.021\times (\Delta A+0.0035)$$

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，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 标曲为非必做实验，用户可根据实验需求制作标曲，亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算。
- 2 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）；
- 3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 μ mol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 4 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 50uL，加入 2.45mL 蒸馏水，混匀得到 1 μ mol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μ mol/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
蒸馏水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 5 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。在 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (μ L)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	50	
蒸馏水		50
试剂五	200	200
混匀，室温静置 3min，700nm 下读取各管吸光值， $\Delta A=A$ 标准-A0 浓度。		