

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

（货号：G0884W 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<br>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<sup>4</sup>）：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  |

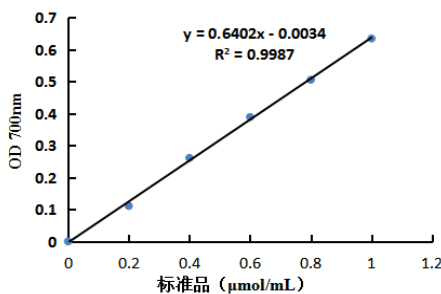
|                               |     |     |
|-------------------------------|-----|-----|
| 样本                            | 100 | 100 |
| 试剂三                           | 10  |     |
| 30°C条件下孵育 30min               |     |     |
| 试剂四                           | 40  | 40  |
| 混匀，12000rpm，4°C离心 5min，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）。 |     |     |

## 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 ( $\mu\text{mol/mL}$ )，y 是  $\Delta A$ 。



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  $1\mu\text{mol}$  无机磷的量为一个酶活力单位。

PTA 活力( $\mu\text{mol/h/mgprot}$ )= $[(\Delta A + 0.0034) \div 0.6404 \times V2] \div (V1 \times Cpr) \div T = 10.62 \times (\Delta A + 0.0034) \div Cpr$

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。

PTA 活力( $\mu\text{mol/h/g}$  鲜重)= $[(\Delta A + 0.0034) \div 0.6404 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T = 10.62 \times (\Delta A + 0.0034) \div W$

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。

PTA 活力( $\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}$ )= $[(\Delta A + 0.0034) \div 0.6404 \times V2] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.021 \times (\Delta A + 0.0034)$

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 ( $50\mu\text{mol/mL}$ )：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.  $\mu\text{mol/mL}$ 。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。