天净沙系列

CAT#:EC1.2.3.6

低温运输，-20℃保存

天净沙

丙酮酸氧化酶（辅酶 A-乙酰化）活性测定试剂盒

Pyruvate Oxidase (CoA-Acetylating) Assay Kit

使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品用于测定将辅酶 A-乙酰化的丙酮酸氧化酶[Pyruvate Oxidase (CoA-Acetylatin)，EC1.2.3.6]活性。其原理是丙酮酸氧化酶（辅酶 A-乙酰化）氧化辅酶 A 为乙酰辅酶 A 并生成过氧化氢，过氧化氢在 240 nm 处有特征光吸收，故通过监测吸光度随时间升高的量即可计算酶活性。本产品具有如下特点：

1. 即开即用，使用便捷，用户不需要优化条件，只需准备待测样本。
2. 提供丙酮酸氧化酶（辅酶 A-乙酰化）阳性对照，便于在遇到问题时分析原因。
3. 最低检测限为 0.18 U，线性范围在.025 U-0.77 U 之间。
4. 本试剂盒 1 个酶活性单位的定义是在 37℃ pH 7.0 的条件下，每分钟能催化 1 μmol 底物转化所需的酶量。由于 1 个丙酮酸氧化酶（辅酶 A-乙酰化）底物分子的转化将产生 1 个过氧化氢分子，故 1 个酶活性单位相当于在 37℃ pH 7.0 的条件下每分钟催化 1 μmol 过氧化氢产生所需的酶量。
5. 本产品足够 100 次 1 mL 体系的比色皿检测或 400 次 250 μL 体系的 96 孔板检测。
6. 本产品只可用于科研。

规格及成分

本产品采用小扁盒包装

成份	编号	规格	包装
丙酮酸氧化酶（辅酶 A-乙酰化）活性测定反应液	EC1.2.3.6r	110 mL	125 mL 本色瓶
丙酮酸氧化酶（辅酶 A-乙酰化）活性测定底物干粉	EC1.2.3.6s	100 T	125 mL 本色瓶
辅酶 A 干粉	CAS:85-61-0	100 T	1.5 mL 棕色管
使用手册	EC1.2.3.6sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期一年。

自备试剂

待测样品，缓冲液，超纯水，蛋白浓度测定试剂盒，比色皿及与之匹配的分光光度计，96 孔板及与之匹配的分光光度计。

使用方法

一、首次使用本试剂盒时配制下列溶液

1. 配制辅酶 A 溶液：将装有辅酶 A 干粉的管短暂离心，再将 1 mL 丙酮酸氧化酶（辅酶 A-乙酰化）活性测定反应液加入其中，颠倒摇晃 20 次溶解，得辅酶 A 溶液。
2. 配制丙酮酸氧化酶（辅酶 A-乙酰化）活性测定底物溶液：将 100 mL 丙酮酸氧化酶（辅酶 A-乙酰化）活性测定反应液加入装有丙酮酸氧化酶（辅酶 A-乙酰化）活性测定底物干粉的瓶中，颠倒摇晃 20 次溶解，得丙酮酸氧化酶（辅酶 A-乙酰化）活性测定底物溶液。

3. 如果一次实验没有用完上述溶液，需要放-20℃或更低温度保存。

二、制备待测样本

4. 用自选方式制备待测样本，样本溶于缓冲液中，缓冲液 pH 值控制为 7.0。注意：由于 Hg2+、Pb2+等重金属离子会严重影响丙酮酸氧化酶（辅酶 A-乙酰化）酶活性，故样本中不得含有这些物质。同时，由于本试剂盒测定的是过氧化氢，故样本中也不得有过氧化氢的成份。
5. 预留 10 mL 最后溶解样本的样本溶解液，作为后续测光吸收时的阴性对照。
6. 用自备试剂测定待测样本的蛋白浓度，以备后续计算比活时使用。

三、1 mL 体系 1 cm 光径比色皿测定

7. 分光光度计 37℃预热 30 分钟以上，根据所用分光光度计一次可以同时测定几个样本决定每次测定的样本数量。下面的操作以每次能测 4 个样本的分光光度计为例。标记 0-3 号共 4 个 1.5 mL 干净塑料离心管，然后按下表分别加入各成份：

成份	0 号管 阴性对照	1 号管 待测样 1	2 号管 待测样 2	3 号管 待测样 3
丙酮酸氧化酶（辅酶 A-乙酰化）活性测定底物溶液	0.96 mL	0.96 mL	0.96 mL	0.96 mL
辅酶 A 溶液	20 μL	20 μL	20 μL	20 μL
涡旋振荡 30 秒混匀，迅速加入下列成份后开始计时				
自备样本溶解液	20 μL	不加	不加	不加
自备待测样本 1	不加	20 μL	不加	不加
自备待测样本 2	不加	不加	20 μL	不加
自备待测样本 3	不加	不加	不加	20 μL
总体积	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL

8. 涡旋振荡 10 秒混匀，将 4 个管中的混合液快速转移到 4 个比色皿中，在 1 分钟时（从加入样本时开始）第 1 次测定 240 nm 的光吸收，然后每分钟测定一次，共测定 6 次。

四、数据处理

9. 计算△A/min 测定值：以时间为横轴，以各样本不同时间点的 A 值为纵轴，绘制反应速率曲线，选择线性区域并计算△A/min，此为测定值。空白样本（0 号阴性对照管）也需要计算此值。
10. 计算△A/min 真实值：样本△A/min 测定值-空白样本△A/min 测定值=样本△A/min 真实值。N 个待测样本将有 N 个数据。

	11. 将△A 换算成每分钟过氧化氢浓度升高：根据朗伯-比尔定律△A = εlc =消光系数*光径*浓度，则所测过氧化氢浓度升高= △A/(消光系数*光径)。代入过氧化氢在 240 nm 的消光系数 43600 L/cm*mol 和所用比色皿光径 1 cm，则过氧化氢浓度升高=△A/[(43600/cm*mol) * 1 cm] = (△A/43.6) mol/L = (△A/43.6) μmol/mL。后面用 x 表示(△A/43.6)。 12. 将每分钟过氧化氢浓度μM 升高转换成每分钟μmol 的升高：酶反应体积为 1 mL，故每分钟过氧化氢升高的μmol 数=浓度*1 mL = (x μmol/mL) * 1 mL = x μmol。 13. 1 个酶活性单位是在 37℃ pH 7.0 条件下每分钟催化 1 μmol 过氧化氢增加所需的酶量，故反应体系中的丙酮酸氧化酶（辅酶 A-乙酰化）酶单位数= x/U。 14. 计算样本中的酶浓度：由于加入到 1 mL 反应体系中的待测样本体积为 0.02 mL（20 μL），故待测样本的酶浓度为 x/U/0.02 mL = 50x U/mL。 15. 计算样本的酶比活性：样本总体积乘以酶浓度 U/mL 即得样本总酶单位数 U，样本总体积乘以其蛋白浓度即得样本总蛋白量（以 mg 为单位），样本酶比活（U/mg）=总酶单位数/总蛋白量。 **四、96 孔板检测** 16. 操作同上，只是在设置反应时，各成份的用量升高 75%，只用 25%，计算时体积不是 1 mL，而是 0.25 mL。同时光径不是 1 cm，要根据所用 96 孔板修改（需要咨询厂家）。消光系数不变。
关联产品	Skygen 3-磷酸甘油酸磷酸酶活性测定试剂盒