天净沙系列

CAT#:EC2.3.1.138

低温运输，4℃保存

天净沙

腐胺 N-羟基肉桂酰转移酶活性测定试剂盒

Putrescine N-Hydroxycinnamoyltransferase 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

本产品是腐胺N-羟基肉桂酰转移酶(Putrescine N-Hydroxycinnamoyltransferase，PHT，EC2.3.1.138) 活性测定试剂盒。其原理是 PHT 催化咖啡酰辅酶 A 和腐胺反应生成游离的辅酶 A。咖啡酰辅酶 A 在 400 nm 处有特征光吸收，故可以通过检测吸光度在 400 nm 处随时间的下降量间接检测 PHT 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 PHT 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 30℃ pH 8.5 的条件下，每分钟能催化 1 μmol 底物转化所需的酶量。由于一次催化反应消耗一分子的咖啡酰辅酶 A，故 1 个酶活性单位相当于在 30℃ pH 8.5 的条件下每分钟消耗 1 μmol 咖啡酰辅酶 A 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
PHT 活性测定反应液	EC2.3.1.138r	120 mL	125 mL 本色瓶
PHT 活性测定底物干粉	EC2.3.1.138s	100 T	125 mL 本色瓶
PHT 酶干粉	28-A0A6A4PR97	5 T	0.5 mL 红盖管
PHT 酶储存液	5-28-A0A6A4PR97	110 μL	0.5 mL 本色管
咖啡酰辅酶 A 干粉	CAS:53034-79-0	100 T	15 mL 本色瓶
使用手册	EC2.3.1.138sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，4℃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 PHT 活性测定底物液：将 100 mL PHT 活性测定反应液加入到装有 PHT 活性测定底物干粉的瓶中，颠倒摇晃 20 次，得 PHT 活性测定底物液。
2. 配制 1 mM 咖啡酰辅酶 A 溶液：将 15 mL PHT 活性测定反应液加入到装有咖啡酰辅酶 A 干粉的管中，颠倒摇晃 20 次，得 1 mM 咖啡酰辅酶 A 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 8.5。注意：由于 Cu2+、Hg2+等金属离子会严重影响 PHT 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咖啡酰辅酶 A，故样本中也不得有咖啡酰辅酶 A 的成分。

5. 预留 10 mL 最后溶解样本的样本溶解液，作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、标准曲线梯度稀释液的制备

7. 每次测量都应制作标准曲线，下面以 6 个稀释度的标准曲线为例。

8. 标记 1-6 个 2 mL 离心管，每个管中加入 1 mL 超纯水。

9. 将第 2 步制备的 1 mM 咖啡酰辅酶 A 溶液为 1 号管样品。

10. 2 号管中加入 1 mL 在第 2 步制备的 1 mM 咖啡酰辅酶 A 溶液，充分震荡 1 分钟，得 0.5 mM 咖啡酰辅酶 A 溶液。放冰上待用。

11. 换枪头，在 3 号管中加入 1 mL 0.5 mM 咖啡酰辅酶 A 溶液（上步稀释所得），充分震荡 1 分钟，得 250 μM 咖啡酰辅酶 A 溶液。放冰上待用。

12. 重复上面的操作直到得到 1 mM、0.5 mM、250 μM、125 μM、62.5 μM、31.25 μM 共 6 个稀释度的样品。放冰上待用。

四、1 mL 体系 1 cm 光径比色皿测定

13. 分光光度计 30℃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。标记 N+7 个 1.5 mL 的塑料离心管，其中 N 个用于待测样品，1 个用于阴性对照，6 个用于标曲，然后按下表分别加入各成分：

成分	阴性对照	N 个样本管	6 个标曲管
各梯度的咖啡酰辅酶 A 溶液	不加	不加	各 980 μL
PHT 活性测定底物液	960 μL	各 960 μL	不加
1 mM 咖啡酰辅酶 A 溶液	20 μL	各 20 μL	不加
涡旋振荡 30 秒混匀，迅速加入下列成分后开始计时			
自备样本溶解液	20 μL	不加	各 20 μL
N 个自备待测样本	不加	各 20 μL	不加
总体积	1 mL	1 mL	1 mL
混合均匀 30℃保温 30 min			

14. 冷却到室温后迅速用分光光度计在 400 nm 测定 OD，测前用蒸馏水调零。

五、数据处理

15. 计算真实 OD400 光吸收：每个样本测得的光吸收减去阴性对照的光吸收即为每个样本的光吸收。共 N+6 个读数。

16. 制备标准曲线：以咖啡酰辅酶 A 溶液的浓度为横轴，以其真实 OD400 光吸收为纵轴，绘制标准曲线。

	17. 根据计算公式，用 N 个样本的 OD400 数据计算出其所对应的咖啡酰辅酶 A 浓度。根据 PHT 活性的定义（每分钟消耗 1 μmol 咖啡酰辅酶 A 所需要的酶量为 1 个单位）计算出酶的活性。 18. 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。 **五、96 孔板检测** 19. 操作同上，只是在设置反应时，各成分的用量降低 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）。 **六、阳性对照** 20. 本试剂盒提供足够 5 次检测的 PHT 阳性对照。在遇到问题时可以用于查找原因。使用时需要加入 100 μL PHT 酶储存液，颠倒 20 次混匀，取 20 μL 按上面的操作步骤进行检测。提供的阳性对照的比活是 0.5 U/mg。
关联产品	[谷氨酰胺合成酶]腺苷酰转移酶活性测定试剂盒