

磷酸二酯酶 (phosphodiesterases, PDEs) 活性测定说明书

(货号: BN72343 分光法 24 样)

一、产品简介:

磷酸二酯酶 (phosphodiesterases, PDEs) (EC 3.1.4.1) 是一类磷酸水解酶, 可以水解环状腺苷酸单磷酸和环状鸟苷酸单磷酸等。

本试剂盒提供一种简单、灵敏、快速的检测方法。催化底物双(4-硝基苯)磷酸酯 (BNPP) 分解生成黄色的产物 PNP, 该产物在 405nm 处有最大吸收峰。通过检测 PNP 在 405nm 下的增加速率, 即可得到磷酸二酯酶 (PDEs) 活性的大小。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 33mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂 mg×2 支	4℃ 保存	每支临用前甩几下使粉体落入底部, 再加 0.7mL 蒸馏水混匀, 现配现用, 一周内用完。
试剂三	液体 6mL×1 瓶	4℃ 保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃ 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、低温离心机、水浴锅、可调式移液器

四、磷酸二酯酶 (PDEs) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品和实验流程, 避免样本和试剂浪费!

1、样本制备:

- ① 组织样本: 取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 4℃×12000rpm 离心 15min, 取上清液待测。

【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 细菌/细胞样本: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【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 的比例进行提取。

- ③ 液体样本: 可直接测定, 或者适当稀释后测定。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

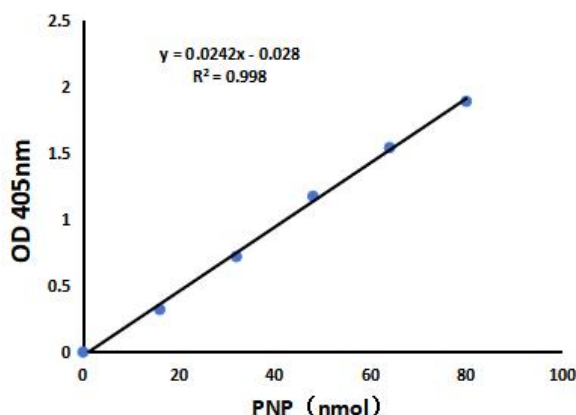
- ① 可见分光光度计预热 30 min, 设置温度 37℃, 调节波长为 405nm, 蒸馏水调零。
② 所有试剂于 37℃ 水浴中预热 30 min。
③ 在 EP 管中或 1mL 玻璃比色皿中依次加入下列试剂:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	空白管 (只做一次)
样本	40	40	40
蒸馏水		40	
试剂一	540	540	540
试剂二	40		40
混匀, 避光反应, 37℃ 水浴或恒温培养箱孵育 20min			
试剂三	100	100	100

混匀，在 37℃ 下静置 5min，立即于 405nm 下读取吸光值 A，
 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}$ 。

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 0.0242x + 0.028$ ，x 是 PNP 摩尔质量：nmol；y 是 ΔA 。



2、按照样本质量计算：

定义：在 37℃ 下，每克组织每分钟水解 1nmol 的 BNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\text{PDEs (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.028) \div 0.0242] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 51.65 \times (\Delta A + 0.028) \div W \times D$$

3、按照样本蛋白浓度计算：

定义：在 37℃ 下，每毫克蛋白每分钟水解 1nmol 的 BNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\text{PDEs (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A + 0.028) \div 0.0242] \div (Cpr \times V1) \div T \times D = 51.65 \times (\Delta A + 0.028) \div Cpr \times D$$

4、按细菌/细胞数量计算：

定义：在 37℃ 下，每 10^4 个细胞每分钟水解 1nmol 的 BNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{PDEs (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A + 0.028) \div 0.0242] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 51.65 \times (\Delta A + 0.028) \div 500 \times D \end{aligned}$$

5、按液体体积计算：

定义：在 37℃ 下，每毫升液体每分钟水解 1nmol 的 BNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\text{PDEs 活力 (nmol/min/mL)} = [(\Delta A + 0.028) \div 0.0242] \div V1 \div T = 51.65 \times (\Delta A + 0.028)$$

W---样品质量，g；

V---提取液体积，1 mL；

V1---上清液体积 (mL)，0.04mL；

T---反应时间，20 min。

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

500---细胞数量，万；

Cpr---上清液蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液 (20 μ mol/mL)：向标准品 EP 管里面加入 0.7mL 纯乙醇超声溶解，若有结晶析出，需 37℃ 水浴至完全溶解。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2 μ mol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 以上面不同浓度点为横坐标 (x)，对应的 ΔA 标准为纵坐标 (y) 绘制标准曲线，得到线性回归方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 测定带入公式中计算 x (μ mol/mL)。