

总磷酸二酯酶(PDEs)活性试剂盒

规格：微量法 48 样

检测原理：BNPP 底物法

编号：ml301004

检测波长：405nm

注意：

正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

磷酸二酯酶 (phosphodiesterase, PDEs) 具有水解细胞内第二信使 (环磷酸腺苷或环磷酸鸟苷) 的功能, 降解细胞内环磷酸腺苷或磷酸鸟苷, 从而终结这些第二信使所传导的生化作用。

测定原理：

磷酸二酯酶(PDEs)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, 计算磷酸二酯酶 (PDEs) 的活性。

需自备的仪器和用品：

磷酸二酯酶(PDEs)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, 计算磷酸二酯酶 (PDEs) 的活性。

试剂的组成

试剂一：粉剂×1 瓶, -20℃避光保存。临用前加入 6mL 试剂二溶解;

试剂二：液体 20mL×1 瓶, 4℃保存;

试剂三：液体 10mL×1 瓶，4°C避光保存。

标准品：粉剂×1 瓶， -20°C避光保存。

样品处理

1、细菌、细胞或组织样品的制备：

细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（10⁴个）：生理盐水(0.9%NaCl)体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 生理盐水），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；10000×g，4°C离心 10min，取上清，置冰上待测。

组织：按照组织质量（g）：生理盐水(0.9%NaCl)体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 生理盐水），进行冰浴匀浆。10000×g 4°C离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、血清（浆）样品：直接检测。

测定步骤：

1、酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 405nm，蒸馏水调零。

2、所有试剂平衡至室温（25°C）。

3、在 96 孔板中依次加入：

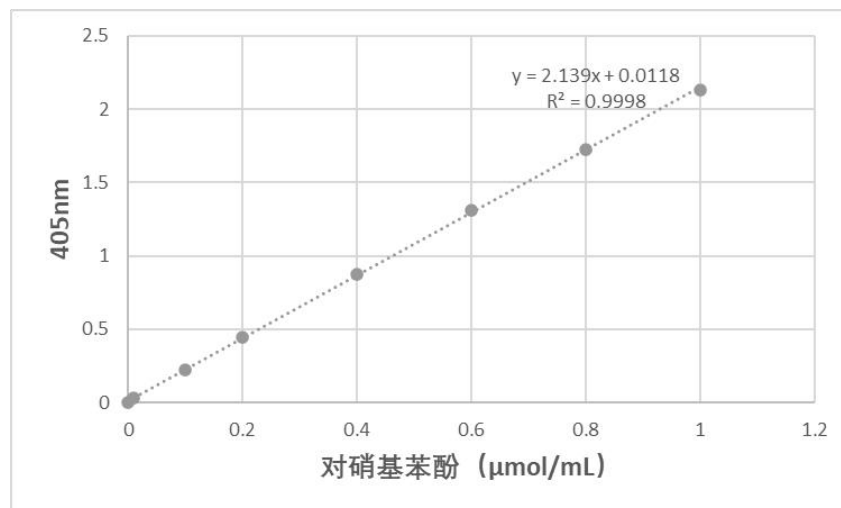
试剂名称（ μL ）	测定管	对照管
样本	50	50
试剂一	50	-
试剂二	50	100
混匀 37°C避光孵育 30min		
试剂三	50	50
混匀 37°C静置 5min 于 405nm 处读取吸光值。 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。		

注意: 如果 ΔA 大于 2 则需要对样本进行稀释, 稀释倍数带入计算公式。如果 ΔA 小于 0.05, 则需要增加样本浓度。

结果计算:

标准条件下测定的回归方程为 $y = 63.396 + 12.679x$, $R^2 = 0.9996$;

x 为标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$), y 为 ΔA 。



1、血清 (浆) PDEs 活性

单位定义: 37°C 条件下, 每升血清(浆)每分钟生成 1 μmol 产物定义为一个酶活力单位。

$$\text{PDEs } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = (\Delta A - 0.0118) \div 2.139 \div T$$

2、组织、细菌或细胞 PDEs 活性

(1) 按样本鲜重计算

单位定义: 每 g 组织每分钟生成 1 μmol 产物定义为一个酶活单位。

$$\text{PDEs } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = (\Delta A - 0.0118) \div 2.139 \times V_{\text{提}} \div W \div T$$

(2) 按细菌或细胞密度计算

单位定义: 每 10^4 个细菌或细胞每分钟生成 1 μmol 产物定义为一个酶活单位。

$$\text{PDEs } (\mu\text{mol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = (\Delta A - 0.0118) \div 2.139 \times V_{\text{提}} \div \text{细胞数量} \div T$$

(3) 按蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 蛋白每分钟生成 1 μ mol 产物定义为一个酶活单位。

$$\text{PDEs } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = (\Delta A - 0.0118) \div 2.139 \div \text{Cpr} \div T$$

V 提：加入提取液体积体积，1 mL；

W：样本质量，g；

细菌或细胞数量，以万计；

T：酶促反应时间，30min

Cpr：蛋白浓度，mg/mL

附：标准曲线制作过程

1. 从标准品管中称取 1.3911mg 加入 1mL 试剂二溶解即为 10 μ mol/mL 标准品，将 10 mmol/L 标准品用试剂二稀释成 1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1, 0 μ mol/mL。

2. 依据下列加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。

试剂名称(μ L)	标准管	空白管
标准品	50	-
试剂一	50	50
试剂二	50	100
混匀 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30min		
试剂三	50	50
混匀 37 $^{\circ}$ C 静置 5min 于 405nm 处读取吸光值。 $\Delta A = A$ 标准管 - A 空白管。		

预实验的意义：

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；
- 5、通过 3 - 5 组预实验，判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。