

## 总磷酸二酯酶(PDEs)活性试剂盒

规格：分光法 24 样

检测原理：BNPP 底物法

编号：ml301005

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：

可见分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、生理盐水、水浴锅和蒸馏水。

### 试剂的组成：

试剂一：粉剂×1 瓶, -20℃避光保存。临用前加入 10mL 试剂二溶解;

试剂二：液体 30mL×1 瓶, 4℃保存;

试剂三：液体 20mL×1 瓶, 4℃避光保存。

标准品：粉剂×1 瓶， -20℃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（10<sup>4</sup>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℃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℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

### 2、血清（浆）样品：直接检测。

## 测定步骤和加样表：

1. 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 405nm，蒸馏水调零。

2. 所有试剂平衡至室温（25℃）

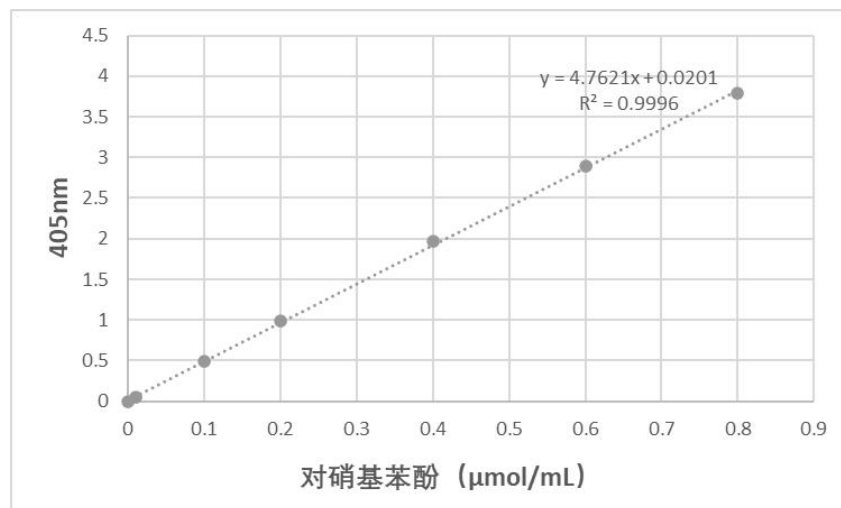
3. 在 1.5mL 棕色 EP 管中依次加入：

试剂名称(μL)	测定管	对照管
样本	250	250
试剂一	250	-
试剂二	250	500
混匀 37℃避光孵育 30min		
试剂三	250	250
混匀 37℃静置 5min 转移至比色皿中于 405nm 处读取吸光值。ΔA = A 测定管-A 对照管。		

注意: 如果 $\Delta A$  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 $\Delta A$  小于 0.05, 则需要增加样本浓度。

### 结果计算:

标准曲线:  $y = 4.7621x + 0.0201$ ,  $R^2 = 0.9996$ ; x 为标准品浓度 ( $\mu\text{mol/mL}$ ), y $\Delta A$ 。



### 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 $\mu\text{mol}$  产物定义为一个酶活力单位。

$$\text{PDEs } (\mu\text{mol/min/mL}) = (\Delta A - 0.0201) \div 4.7621 \div T$$

### 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  $\mu\text{mol}$  产物定义为一个酶活单位。

$$\text{PDEs } (\mu\text{mol/min/g 鲜重}) = (\Delta A - 0.0201) \div 4.7621 \times V_{\text{提}} \div W \div T$$

#### (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  $\mu\text{mol}$  产物定义为一个酶活单位。

$$\text{PDEs } (\mu\text{mol/min}/10^4 \text{ cell}) = (\Delta A - 0.0201) \div 4.7621 \times V_{\text{提}} \div \text{细胞数量} \div T$$

### (3) 按蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 蛋白每分钟生成 1  $\mu\text{mol}$  产物定义为一个酶活单位。

$$\text{PDEs } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = (\Delta A - 0.0201) \div 4.7621 \div \text{Cpr} \div T$$

V 提：加入提取液体积，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 $\mu\text{mol}/\text{mL}$  标准品，将 10mmol/L 标准品用试剂二稀释成 1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1, 0 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。
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( $\mu\text{L}$ )	标准管	空白管
标准品	250	-
试剂一	250	250
试剂二	250	500
混匀 37°C 避光孵育 30min		
试剂三	250	250
混匀 37°C 静置 5min 于 405nm 处读取吸光值。 $\Delta A = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。		

### 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。