

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

（货号：G0931W 微板法 48 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 20mL×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 4mL×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：

酶标仪、96 孔板、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、蒸馏水。

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 酶标仪预热 30 min，设置温度 37℃，调节波长为 405nm。
 ② 所有试剂于 37℃水浴中预热 30 min。
 ③ 在 96 孔板中依次加入下列试剂：

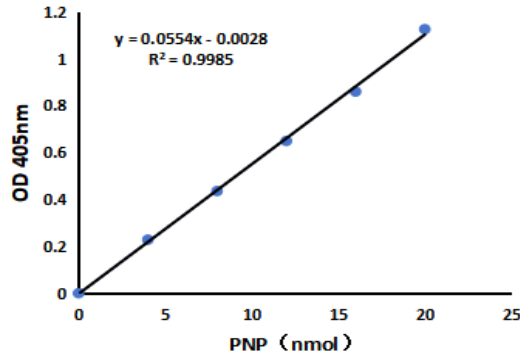
试剂名称(μL)	测定管	对照管	空白管（只做一次）
样本	10	10	
蒸馏水		20	10
试剂一	140	140	140
试剂二	20		20
混匀，避光反应，37℃水浴或恒温培养箱孵育 20min			
试剂三	30	30	30
混匀，在 37℃下静置 5min，立即于 405nm 下读取吸光值 A， $\Delta A = A_{测定} - A_{对照} - A_{空白}$ 。			

【注】：① 若 ΔA 的值小于 0.01, 可增加样本量 V1 (如增至 20 μ L, 则试剂一相应减少); 或延长反应时间 T (如增至 40min 或更长); 或增加取样质量 W; 则重新调整的 V1 和 T 和 W 须代入公式重新计算。

② 若 ΔA 的值超过 1, 则需要用蒸馏水稀释样本再检测, 稀释倍数 D 代入计算公式。

五、结果计算:

1、标准曲线: $y = 0.0554x - 0.0028$, x 是 PNP 摩尔质量: nmol; y 是 ΔA 。



2、按照样本质量计算:

定义: 在 37°C 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。

$$PDEs(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0028) \div 0.0554] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 90.3 \times (\Delta A + 0.0028) \div W \times D$$

3、按照样本蛋白浓度计算:

定义: 在 37°C 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。

$$PDEs(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0028) \div 0.0554] \div (Cpr \times V1) \div T \times D = 90.3 \times (\Delta A + 0.0028) \div Cpr \times D$$

4、按细菌/细胞数量计算:

定义: 在 37°C 下, 每 10⁴ 个细胞每分钟水解 1nmol 的 BNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$PDEs(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0028) \div 0.0554] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D = 90.3 \times (\Delta A + 0.0028) \div 500 \times D$$

5、按液体体积计算:

定义: 在 37°C 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。

$$PDEs \text{ 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0028) \div 0.0554] \div V1 \div T \times D = 90.3 \times (\Delta A + 0.0028) \times D$$

W---样品质量, g;

V---提取液体积, 1 mL;

V1---上清液体积 (mL), 0.01mL;

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°C 水浴至完全溶解。
- 2 把母液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 依据 10 μ L 标准品+140 μ L 试剂一+20 μ L 蒸馏水+30 μ L 试剂三, 混匀, 在 37°C 下静置 5min 后于 405nm 下读取吸光值 A, 根据结果即可制作标准曲线。