

磷脂酸磷酸酯酶 (Phosphatidate phosphatase) 活性测定试剂盒

(货号: ADS-F-PP001 分光法 48 样)

一、产品简介:

磷脂酸磷酸酯酶也称为磷酸化酶磷酸酯酶 (EC 3.1.3.17, PPase) 是磷酸酯酶中的一种, 在脂类合成的信号传递中发挥着重要作用, 其活性对含油量的提高具有重要意义, 可作为育种选择高含油量品种的生化指标。

本试剂盒利用磷脂酸磷酸酯酶 (PPase) 催化 β -甘油磷酸分解产生无机磷分子, 通过定磷试剂测定无机磷增加速率, 即可得出磷脂酸磷酸酯酶 (PPase) 活性大小。

二、试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉体 1 瓶	4°C保存	临用前甩几下使粉末全部落入底部, 加入 9mL 蒸馏水混匀溶解备用。
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	A:粉体 1 瓶 B:液体 6mL×1 瓶	4°C保存	临用前在试剂 A 中加 5.8mL 的 B 液, 再加 74.2mL 的蒸馏水, 混匀溶解备用。
标准品	粉体 1 支	4°C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

【注】:全程需无磷环境; 试剂配置最好用新枪头和玻璃移液器等, 也可用一次性塑料器皿, 避免磷污染。

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、水浴锅或恒温培养箱、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、磷脂酸磷酸酯酶 (PPase) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

- ① 组织样本: 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。4°C×12000rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【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 的比例进行提取。

- ② 液体样本: 直接检测; 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 以上, 调节波长到 700nm, 蒸馏水调零。
- ② 所有试剂解冻至室温 (25°C)。
- ③ 依次在 EP 管孔板中加入:

试剂名称 (μ L)	测定管	对照管
试剂一	300	300
试剂二	75	75
样本	75	
35°C 孵育 30min		
试剂三	150	150
样本		75
混匀, 12000rpm, 4°C 离心 5min, 上清液待测		

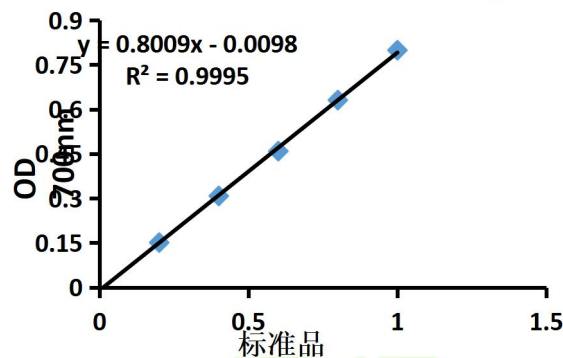
③ 显色反应，在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中加入：

上清液	150	150
试剂四	600	600
混匀，室温静置 3min，700nm 下读取各管吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本做一个自身对照）。		

【注】若 ΔA 在零附近，可增加样本加样体积 V_1 （如增至 100 μ L，则试剂一相应减少），或延长反应时间 T （如增至 1 小时），则改变后的 V_1 和 T 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.8009x - 0.0098$ ， x 是标准品浓度（ $\mu\text{mol/mL}$ ）， y 是 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算：

定义：每小时每毫克组织蛋白催化产生 1 μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{PPase 酶活力}(\mu\text{mol/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0098) \div 0.8009 \times V_2] \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \div T$$

$$= 20 \times (\Delta A + 0.0098) \div C_{\text{pr}}$$

3、按样本鲜重计算：

定义：每小时每克组织催化产生 1 μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{PPase 酶活力}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0098) \div 0.8009 \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) \div T$$

$$= 20 \times (\Delta A + 0.0098) \div W$$

4、液体中 PPase 活力计算：

定义：每小时每毫升液体催化产生 1 μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{PPase 酶活力}(\mu\text{mol/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0098) \div 0.8009 \times V_2] \div V_1 \div T = 20 \times (\Delta A + 0.0098)$$

V ---提取液体积，1mL； V_1 ---样本体积，0.075mL； V_2 ---酶促反应总体积，0.6mL；

T ---反应时间，1/2 小时； W ---样本鲜重，g；

C_{pr} ---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

1. 制备标准品母液（50 $\mu\text{mol/mL}$ ）：标准品用 1mL 试剂一溶解。（母液需在两天内用）。
2. 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
3. 依据显色反应阶段测定管的加样体系操作，根据结果即可制作标准曲线。