

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

（货号：ADS-W-PP001 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂一	液体 40mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	粉体 1 瓶	4℃避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 11mL 蒸馏水混匀溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	A:粉体 1 瓶 B:液体 4mL×1 瓶	4℃避光保存	1. 临用前在试剂 A 中加 5.7mL 的 B 液，再加 44.3mL 的蒸馏水，混匀溶解备用； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	粉体 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

【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、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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℃×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、检测步骤：

① 酶标仪预热 30 min 以上，调节波长到 700nm，所有试剂解冻至室温（25℃）。

② 依次在 EP 管孔板中加入：

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
试剂一	200	200
试剂二	50	50
样本	50	
35°C 孵育 30min		
试剂三	100	100
样本		50
混匀, 12000rpm, 4°C离心 5min, 上清液待测		

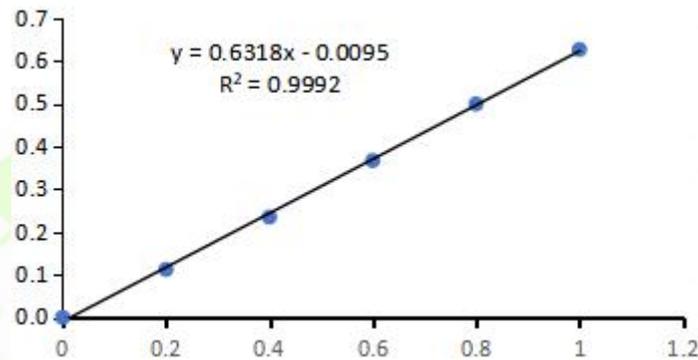
③ 显色反应, 在 96 板中加入:

上清液	50	50
试剂四	200	200
混匀, 室温静置 3min, 700nm 下读取各管吸光值, ΔA=A 测定-A 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 V1 (如增至 100μL, 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 V1 和 T 需代入公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y=0.6318x - 0.0095$, x 是标准品浓度 (μmol/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 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{PPase 酶活力}(\mu\text{mol/h/mg prot})=[(\Delta A+0.0095)\div 0.6318\times V2]\div(V1\times Cpr)\div T$$

$$=25.3\times(\Delta A+0.0095)\div Cpr$$

3、按样本鲜重计算:

定义: 每小时每克组织催化产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{PPase 酶活力}(\mu\text{mol/h/g 鲜重})=[(\Delta A+0.0095)\div 0.6318\times V2]\div(W\times V1\div V)\div T$$

$$=25.3\times(\Delta A+0.0095)\div W$$

4、液体中 PPase 活力计算:

定义: 每小时每毫升液体催化产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{PPase 酶活力}(\mu\text{mol/h/mL})=[(\Delta A+0.0095)\div 0.6318\times V2]\div V1\div T=25.3\times(\Delta A+0.0095)$$

V---提取液体积, 1mL; V1---样本体积, 0.05mL; V2---酶促反应总体积, 0.4mL;

T---反应时间, 1/2 小时; W---样本鲜重, g;

Cpr---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 标准品用 1mL 试剂一溶解，标准品母液浓度为 50 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 20 μL ，加入 980 μL 蒸馏水，混匀得到 1 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 的标品稀释液待用。						
标品浓度 $\mu\text{mol}/\text{mL}$	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据显色反应阶段测定管加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	50	
蒸馏水		50
试剂四	200	200
混匀，室温静置 3min，700nm 下读取各管吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{0 浓度管}}$		