

磷脂酸磷酸酯酶(PPase)活性测定试剂盒

微板法 96 样

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。

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 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 40mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉体 mg×1 瓶	4℃保存	临用前甩几下使粉末全部落入底部, 加入 11mL 蒸馏水混匀溶解备用。
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	A:粉体 mg×1 瓶 B:液体 4mL×1 瓶	4℃保存	临用前在试剂 A 中加 3.6mL 的 B 液, 再加 46.4mL 的蒸馏水, 混匀溶解备用。
标准品	粉体 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、低温离心机、水浴锅或恒温培养箱、可调式移液器、研钵、冰。

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 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°C)。

② 依次在 EP 管孔板中加入:

试剂名称 (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。		

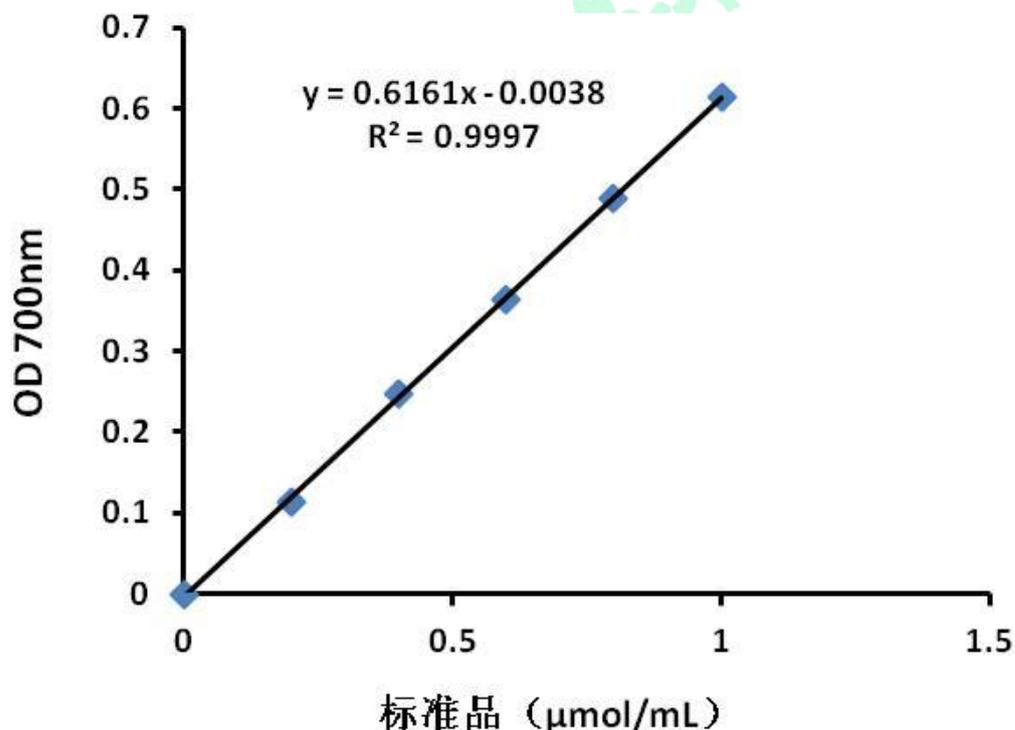
③ 显色反应, 在 96 板中加入:

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, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (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 μL , 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。

结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.6161x - 0.0038$, 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。

PPase 酶活力($\mu\text{mol/h/mg prot}$) = $[(\Delta A + 0.0038) \div 0.6161 \times V_2] \div (V_1 \times C_{pr}) \div T$

$$=26 \times (\Delta A + 0.0038) \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{PPase 酶活力}(\mu\text{mol/h/g 鲜重})=[(\Delta A + 0.0038) \div 0.6161 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T$$

$$=26 \times (\Delta A + 0.0038) \div W$$

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。

$$\text{PPase 酶活力}(\mu\text{mol/h/mL})=[(\Delta A + 0.0038) \div 0.6161 \times V2] \div V1 \div T = 26 \times (\Delta A + 0.0038)$$

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. 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。