

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

分光法 48 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 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉体 mg×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 mg×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 mg×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。

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。

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 (μL)	测定管	对照管
样本	300	300
试剂一	75	75
试剂二	75	
35°C 孵育 30min。		
试剂三	150	150

样本		75
混匀，12000rpm，4℃离心 5min，上清液待测。		

③ 显色反应，在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

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）。		

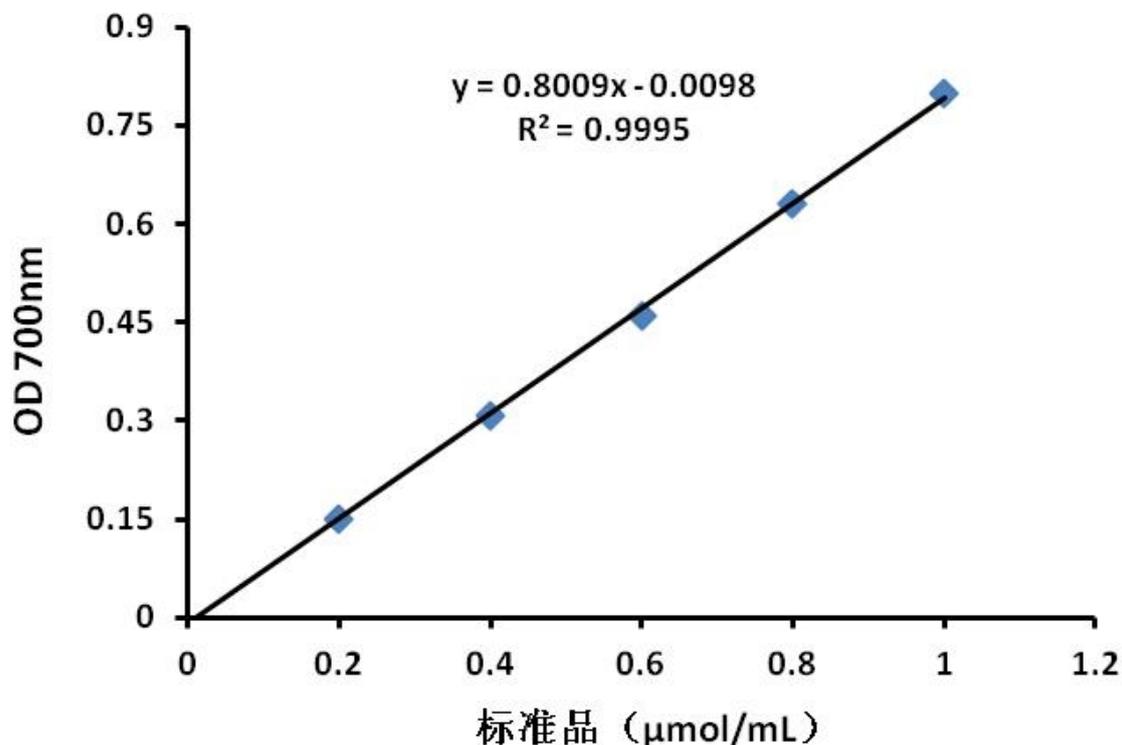
[注]：若 ΔA 在零附近，可增加样本加样体积 V_1 （如增至 100 μL ，则试剂一相应减少），

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：

$y = 0.0317x - 0.0095$ ， x 是标准品摩尔质量：nmol， 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 μ mol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{PPase 酶活力}(\mu\text{mol/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0098) \div 0.8009 \times V_2] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 20 \times (\Delta A + 0.0098) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算：

定义：每小时每克组织催化产生 1 μ mol 无机磷的量为一个酶活力单位。PPase 酶活力(μ

$$\begin{aligned} \text{mol/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0098) \div 0.8009 \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) \div T \\ &= 20 \times (\Delta A + 0.0098) \div W \end{aligned}$$

4、液体中 PPase 活力计算：

定义：每小时每毫升液体催化产生 1 μ mol 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; V1---样本体积, 0.075mL ; V2---酶促反应总体积, 0.6mL;

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 μ 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. μ 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。