

Phosphodiesterases Activity Assay Kit

磷酸二酯酶（PDEs）活性测定说明书

货号： | 方法：微板法 | 规格：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 蒸馏水溶解（可室温超声辅助溶解），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（10⁴）：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			

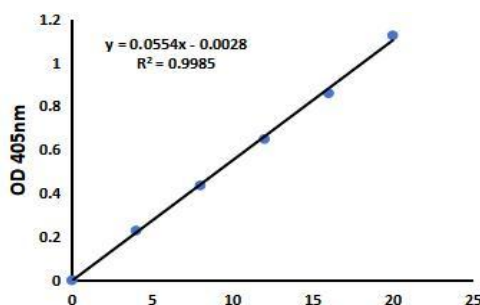
试剂三	30	30	30
混匀，在 37°C 下静置 5min，立即于 405nm 下读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}$ 。			

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；

针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

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 。



标准曲线示意图

说明：标准曲线由标准品测定获得，具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

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。

$$\text{PDEs (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0028) \div 0.0554] \div (W \times V_1 \div V) \div T \times D = 90.3 \times (\Delta A + 0.0028) \div W \times D$$

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。

$$\text{PDEs (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0028) \div 0.0554] \div (C_{pr} \times V_1) \div T \times D = 90.3 \times (\Delta A + 0.0028) \div C_{pr} \times D$$

4、按细菌/细胞数量计算：

定义：在 37°C 下，每 10^4 个细胞每分钟水解 1nmol 的 BNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{PDEs (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A + 0.0028) \div 0.0554] \div (500 \times V_1 \div V) \div T \times D \\ &= 90.3 \times (\Delta A + 0.0028) \div 500 \times D \end{aligned}$$

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。

$$\text{PDEs 活力 (nmol/min/mL)} = [(\Delta A + 0.0028) \div 0.0554] \div V_1 \div T \times D = 90.3 \times (\Delta A + 0.0028) \times D$$

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。