

Phosphatidic acid phosphatase (PPase) Activity Assay kit

磷脂酸磷酸酯酶活性测定试剂盒说明书

货号:BN72361 | 方法: 可见分光法 | 规格: 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 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。

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 (μL)	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℃ 离心 5min, 上清液待测		

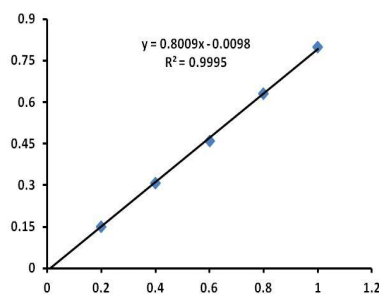
③ 显色反应, 在 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中加入:

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、标准曲线方程: $y = 0.8009x - 0.0098$, x 是标准品浓度 ($\mu\text{mol/mL}$), 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、按蛋白浓度计算:

定义: 每小时每毫克组织蛋白催化产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

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

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

3、按样本鲜重计算:

定义: 每小时每克组织催化产生 $1\mu\text{mol}$ 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 $1\mu\text{mol}$ 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; 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;

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。