

磷酸二酯酶（phosphodiesterases, PDEs）活性测定说明书

（货号：G0931W 微板法 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°C 保存	
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	粉剂 mg×2 支	4°C 保存	每支临用前甩几下使粉体落入底部，再加 0.7mL 蒸馏水混匀，现配现用，一周内用完。
试剂三	液体 4mL×1 瓶	4°C 保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4°C 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°C×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°C 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。

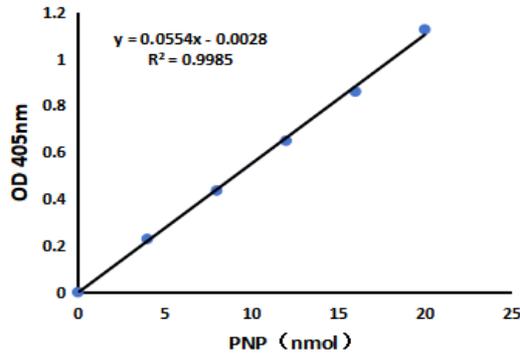
2、上机检测：

- ① 酶标仪预热 30 min，设置温度 37°C，调节波长为 405nm。
 ② 所有试剂于 37°C 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°C 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， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}$			

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 。



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。

$$\text{PDEs}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0028) \div 0.0554] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 90.3 \times (\Delta A + 0.0028) \div W \times D$$

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。

$$\text{PDEs}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0028) \div 0.0554] \div (Cpr \times V1) \div T \times D = 90.3 \times (\Delta A + 0.0028) \div Cpr \times D$$

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。

$$\begin{aligned} \text{PDEs}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0028) \div 0.0554] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 90.3 \times (\Delta A + 0.0028) \div 500 \times D \end{aligned}$$

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。

$$\text{PDEs 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0028) \div 0.0554] \div V1 \div T \times D = 90.3 \times (\Delta A + 0.0028) \times D$$

W---样品质量，g；

V1---上清液体积 (mL)，0.01mL；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

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。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液 (20 $\mu\text{mol}/\text{mL}$)：向标准品 EP 管里面加入 0.7mL 纯乙醇超声溶解，若有结晶析出，需 37°C 水浴至完全溶解。
- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据 10 μL 标准品+140 μL 试剂一+20 μL 蒸馏水+30 μL 试剂三，混匀，在 37°C 下静置 5min 后于 405nm 下读取吸光值 A，根据结果即可制作标准曲线。