

焦磷酸酶(PPase)活性测定试剂盒说明书

(货号: G0938W96 微板法 96 样)

一、产品简介:

焦磷酸酶(焦磷酸盐磷酸水解酶, EC 3.6.1.1)催化焦磷酸盐水解成正磷酸盐。在维持细胞正常代谢方面发挥重要作用。

本试剂盒提供一种简单、灵敏、快速的检测方法。焦磷酸酶催化焦磷酸盐水解成磷酸盐。可通过在 700nm 处测定生成的无机磷量来确定该酶活性大小。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 120mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 50mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉体 mg×1 瓶	4°C保存	用前甩几下使试剂落入底部, 再加 6.4mL 蒸馏水, 混匀溶解备用。
试剂三	液体 42mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	粉体 mg×1 支	4°C保存	临用甩几下使试剂落入底部, 再加 4.2mL 蒸馏水, 混匀溶解备用。
试剂五	粉体 mg×7 支	4°C保存	临用甩几下使试剂落入底部, 每支再加 1.5mL 蒸馏水, 混匀溶解备用, 现配现用。
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】: 全程操作需无磷环境; 试剂配置最好用新的枪头和玻璃移液器等, 也可以用一次性塑料器皿, 避免磷污染。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、恒温培养箱、分析天平、可调式移液器、蒸馏水。

四、焦磷酸酶(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: 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(10^4): 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, 调节波长到 700 nm。

② 反应 mix 制备: 试剂四和五按照要求加蒸馏水溶解后, 按试剂三: 四: 五=10:2:5 的比例依次混合配置(需现配现用, 若出现蓝色则需弃掉重新配置)。

③ 在离心管中依次加入下列试剂:

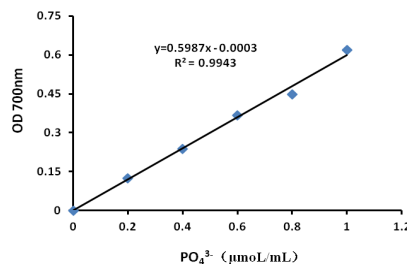
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	50	50
试剂一	220	220
试剂二	30	
混匀, 37°C振荡孵育 30min		
试剂三	100	100
试剂二		30
立即混匀, 于 12000rpm, 室温或 4°C离心 5min, 上清液需立即测定, 不可久置。		

④ 显色反应, 在 96 孔板中依次加入:

上清液	50	50
反应 mix	150	150
混匀, 室温静置 15min, 于 700nm 处读取吸光值 A, ΔA=A 测定-A 对照 (每个样本需做一个样本自身对照)。		

五、结果计算:

1、标准曲线: $y=0.5987x - 0.0003$; x 是标准品摩尔浓度 ($\mu\text{mol/mL}$), y 是 ΔA 。



2、按照样本质量计算:

定义: 每克组织每小时水解 $1\mu\text{mol}$ 焦磷酸产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷为 1 个酶活单位。

$$\text{PPase}(\mu\text{mol/h/g}) = [(\Delta A + 0.0003) \div 0.5987 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 26.7 \times (\Delta A + 0.0003) \div W \times D$$

3、按照样本蛋白浓度计算:

定义: 每毫克蛋白每小时水解 $1\mu\text{mol}$ 焦磷酸产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷为 1 个酶活单位。

$$\text{PPase}(\mu\text{mol/h/mgprot}) = [(\Delta A + 0.0003) \div 0.5987 \times V2] \div (Cpr \times V1) \div T \times D = 26.7 \times (\Delta A + 0.0003) \div Cpr \times D$$

4、按细菌/细胞数量计算:

定义: 每 10^6 个细胞每小时水解 $1\mu\text{mol}$ 焦磷酸产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷为 1 个酶活单位。

$$\text{PPase}(\mu\text{mol/h}/10^6 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0003) \div 0.5987 \times V2] \div (5 \times V1 \div V) \div T \times D = 26.7 \times (\Delta A + 0.0003) \div 5 \times D$$

5、按液体体积计算:

定义: 每毫升液体每小时水解 $1\mu\text{mol}$ 焦磷酸产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷为 1 个酶活单位。

$$\text{PPase}(\mu\text{mol/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0003) \div 0.5987 \times V2] \div V1 \div T \times D = 26.7 \times (\Delta A + 0.0003) \times D$$

W--样品质量, g; V--提取液体积, 1 mL; V1--上清液体积 (mL), 0.05mL; T--反应时间, 30 min=0.5h;

V2---第③步反应总体积, 0.4mL; D--稀释倍数, 未稀释即为 1; 5--细胞数量, 百万;

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。

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 蒸馏水溶解。(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. $\mu\text{mol/mL}$ 。
- 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。