

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

（微板法 96 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 100mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 40mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉体 mg×1 瓶	4℃ 保存	临用前甩几下使粉末全部落入底部，加入 11mL 蒸馏水混匀溶解备用。
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	A:粉体 mg×1 瓶 B:液体 4mL×1 瓶	4℃ 保存	临用前在试剂 A 中加 3.6mL 的 B 液，再加 46.4mL 的蒸馏水，混匀溶解备用。
标准品	粉体 mg×1 支	4℃ 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：

酶标仪、96 孔板、低温离心机、水浴锅或恒温培养箱、可调式移液器、研钵、冰。

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℃×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 酶标仪预热 30 min 以上，调节波长到 700nm，所有试剂解冻至室温（25℃）。

- ② 依次在 EP 管孔板中加入：

试剂名称（ μ L）	测定管	对照管
试剂一	200	200
试剂二	50	50
样本	50	
35℃ 孵育 30min		
试剂三	100	100
样本		50
混匀，12000rpm，4℃离心 5min，上清液待测		

- ③ 显色反应，在 96 板中加入：

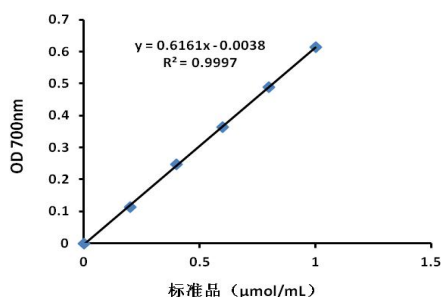
上清液	50	50
-----	----	----

试剂四	200	200
混匀，室温静置 3min，700nm 下读取各管吸光值， $\Delta A=A$ 测定-A 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 $100\mu\text{L}$ ，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。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y=0.6161x - 0.0038$ ， x 是标准品浓度（ $\mu\text{mol/mL}$ ）， 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 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{PPase 酶活力}(\mu\text{mol/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0038) \div 0.6161 \times V_2] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 26 \times (\Delta A + 0.0038) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算：

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

$$\begin{aligned} \text{PPase 酶活力}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0038) \div 0.6161 \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) \div T \\ &= 26 \times (\Delta A + 0.0038) \div W \end{aligned}$$

4、液体中 PPase 活力计算：

定义：每小时每毫升液体催化产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{PPase 酶活力}(\mu\text{mol/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0038) \div 0.6161 \times V_2] \div V_1 \div T = 26 \times (\Delta A + 0.0038)$$

V ---提取液体积，1mL； V_1 ---样本体积，0.05mL； V_2 ---酶促反应总体积，0.4mL；

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（ $50\mu\text{mol/mL}$ ）：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. $\mu\text{mol/mL}$ 。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。