

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

**产品货号：E-BC-K782-M**

**产品规格：96T(40 samples)**

**检测仪器：酶标仪(400-410 nm)**

## **Elabscience®总磷酸二脂酶（PDEs）比色法测试盒**

**Total Phosphodiesterase (PDEs) Acitivity**

**Colorimetric Assay Kit**

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：[biochemical@elabscience.cn](mailto:biochemical@elabscience.cn)

网址：[www.elabscience.cn](http://www.elabscience.cn)

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清（浆）、动物组织、细胞样本中的总磷酸二酯酶（PDEs）的活力。

检测原理

磷酸二酯酶（phosphodiesterase, PDEs）具有水解细胞内第二信使（环磷酸腺苷或环磷酸鸟苷）的功能，降解细胞内环磷酸腺苷或磷酸鸟苷，从而终结这些第二信使所传导的生化作用。

本试剂盒的原理是：通过总 PDEs 水解底物，产生的物质在 405 nm 处有最大吸收峰。通过测定 405 nm 处的 OD 值大小和标准曲线计算样本中总 PDEs 活力。

本试剂盒检测动物组织或细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒（货号 E-BC-K318-M）进行测定。

提供试剂和物品

| 编号                 | 名称                                                    | 规格<br>(Size)(96 T) | 保存方式<br>(Storage)  |
|--------------------|-------------------------------------------------------|--------------------|--------------------|
| 试剂一<br>(Reagent 1) | 缓冲液<br>(Buffer Solution)                              | 25 mL × 1 瓶        | -20℃ 保存 6 个月       |
| 试剂二<br>(Reagent 2) | 底物<br>(Substrate)                                     | 0.2 mL × 1 支       | -20℃ 避光<br>保存 6 个月 |
| 试剂三<br>(Reagent 3) | 盐溶液<br>(Saline Solution)                              | 0.25 mL × 1 支      | -20℃ 避光<br>保存 6 个月 |
| 试剂四<br>(Reagent 4) | 100 mmol/L 标准品溶液<br>(100 mmol/L Standard<br>Solution) | 0.2 mL × 1 支       | -20℃ 避光<br>保存 6 个月 |
|                    | 96 孔酶标板                                               | 96 孔×1 块           | 无要求                |
|                    | 96 孔覆膜                                                | 2 张                |                    |
|                    | 样本位置标记表                                               | 1 张                |                    |

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。  
对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

## 所需自备物品

**仪器：**酶标仪（波长 400-410 nm，最佳检测波长 405 nm），恒温箱

**试剂：**生理盐水（0.9% NaCl）

## 试剂准备

① 检测前，试剂盒中试剂平衡至室温(25℃)。

② 试剂二工作液的配制：

将试剂二：试剂一按体积比=1：99配制，混匀，按需配制，现配现用，当天有效。

③ 反应工作液的配制：

将试剂三：试剂二工作液按体积比=1：99配制，混匀，按需配制，现配现用，4 h内使用有效。

④ 对照工作液的配制：

将试剂三：试剂一按体积比=1：99配制，混匀，按需配制，现配现用，4 h内使用有效。

⑤ 1 mmol/L标准品的配制：

将试剂四：试剂一按体积比=1：99配制，混匀，按需配制，现配现用，当天有效。

⑥ 不同浓度标准品的稀释：

| 编号               | ①   | ②   | ③   | ④   | ⑤   | ⑥   | ⑦   | ⑧   |
|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 标准品浓度(mmol/L)    | 0   | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.7 | 1.0 |
| 1 mmol/L 标准品(μL) | 0   | 40  | 60  | 80  | 100 | 120 | 140 | 200 |
| 试剂一(μL)          | 200 | 160 | 140 | 120 | 100 | 80  | 60  | 0   |

样本准备

① 样本处理

血清(浆)：直接检测。

组织样本：按照组织样本质量(g)：生理盐水(0.9% NaCl)体积(mL)=1：9 的比例匀浆，4℃，10000 × g离心10 min，取上清液，置于冰上待测，4 h内有效。留取部分上清，进行蛋白浓度测定。

细胞样本：取1×10<sup>6</sup>个细胞加入200 μL生理盐水(0.9% NaCl)匀浆，4℃，10000 × g，离心10 min，取上清液，置于冰上待测，4 h内有效。留取部分上清，进行蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.16-16.64 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

| 样本                            | 稀释倍数 | 样本                             | 稀释倍数 |
|-------------------------------|------|--------------------------------|------|
| 人血浆                           | 不稀释  | 兔血清                            | 不稀释  |
| 10%小鼠肝组织                      | 不稀释  | 10%小鼠肾组织                       | 1-2  |
| 10%小鼠小肠组织                     | 不稀释  | 10%小鼠心组织                       | 2-3  |
| HL-60 细胞(1×10 <sup>6</sup> 个) | 不稀释  | 293T 细胞(1×10 <sup>6</sup> 个)   | 不稀释  |
| Hela 细胞(1×10 <sup>6</sup> 个)  | 不稀释  | Molt-4 细胞(1×10 <sup>6</sup> 个) | 不稀释  |

注：稀释液为生理盐水(0.9% NaCl)。

实验关键点

试剂盒所有试剂确保平衡至室温(25℃)。

操作步骤

- ① 标准孔：取 20  $\mu\text{L}$  不同浓度的标准品溶液，分别加入相应的酶标孔中。  
测定孔：取 20  $\mu\text{L}$  待测样本加入相应的酶标孔中。  
对照孔：取 20  $\mu\text{L}$  待测样本加入相应的酶标孔中。
- ② 向步骤①中各测定孔、标准孔加入 180  $\mu\text{L}$  反应工作液。  
向步骤①中的对照孔加入 180  $\mu\text{L}$  对照工作液。
- ③ 振板 5 s，37 $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 60 min，使用酶标仪于 405 nm 检测各孔的 OD 值。

操作表

|                                                                    | 标准孔 | 测定孔 | 对照孔 |
|--------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 不同浓度标准品溶液( $\mu\text{L}$ )                                         | 20  | --  | --  |
| 待测样本( $\mu\text{L}$ )                                              | --  | 20  | 20  |
| 反应工作液( $\mu\text{L}$ )                                             | 180 | 180 | --  |
| 对照工作液( $\mu\text{L}$ )                                             | --  | --  | 180 |
| 振板 5 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 60 min，使用酶标仪于 405 nm 检测各孔的 OD 值。 |     |     |     |

本试剂盒检测组织或细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法（货号：E-BC-K318-M）。

## 结果计算

标准品拟合曲线:  $y = ax + b$

### ① 组织与细胞样本中磷酸二脂酶(PDEs)酶活计算公式:

定义: 37°C 条件下, 每克组织或细胞蛋白在每升反应体系中每分钟生成 1  $\mu\text{mol}$  产物定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{总 PDEs 活力} &= (\Delta A - b) \div a \div C_{\text{pr}} \times f \div T \times 1000^* \\ (\text{U/gprot}) \end{aligned}$$

### ② 血清(浆)样本中磷酸二脂酶(PDEs)酶活计算公式:

定义: 37°C 条件下, 每升血清(浆)在每升反应体系中每分钟生成 1  $\mu\text{mol}$  产物定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{总 PDEs 活力} &= (\Delta A - b) \div a \times f \div T \times 1000^* \\ (\text{U/L}) \end{aligned}$$

### 注解:

y: 标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

$\Delta A$ : 样本的绝对 OD 值(测定孔 OD 值-对照孔 OD 值)

$C_{\text{pr}}$ : 匀浆后样本蛋白浓度, gprot/L

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

T: 反应时间, 60 min

1000\*: 1 mmol/L=1000  $\mu\text{mol/L}$

## 附录1 关键数据

### 1. 技术参数

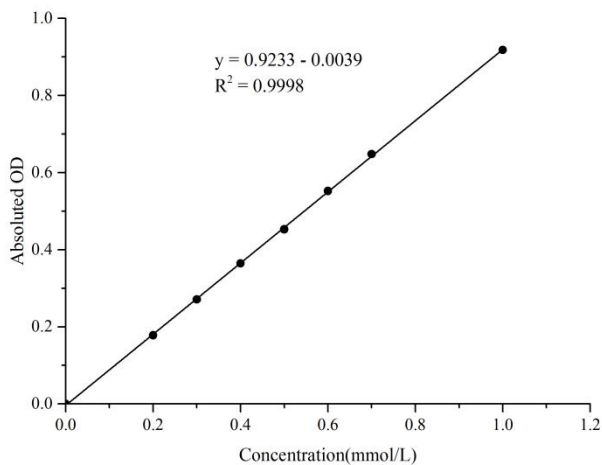
|       |                |     |          |
|-------|----------------|-----|----------|
| 检测范围  | 0.16-16.64 U/L | 批间差 | 4.1-5.6% |
| 灵敏度   | 0.16 U/L       | 批内差 | 1.2-3.0% |
| 稀释回收率 | 99-100%        |     |          |

### 2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量20  $\mu$ L, 按照操作步骤进行实验, OD值如下表所示:

| 标准品浓度<br>(mmol/L) | 0     | 0.2   | 0.3   | 0.4   | 0.5   | 0.6   | 0.7   | 1.0   |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| OD 值              | 0.055 | 0.235 | 0.328 | 0.421 | 0.507 | 0.612 | 0.704 | 0.979 |
|                   | 0.055 | 0.231 | 0.324 | 0.418 | 0.509 | 0.602 | 0.702 | 0.967 |
| 平均 OD 值           | 0.055 | 0.233 | 0.326 | 0.420 | 0.508 | 0.607 | 0.703 | 0.973 |
| 绝对 OD 值           | 0     | 0.178 | 0.271 | 0.365 | 0.453 | 0.552 | 0.648 | 0.918 |

② 绘制标曲(如下图):



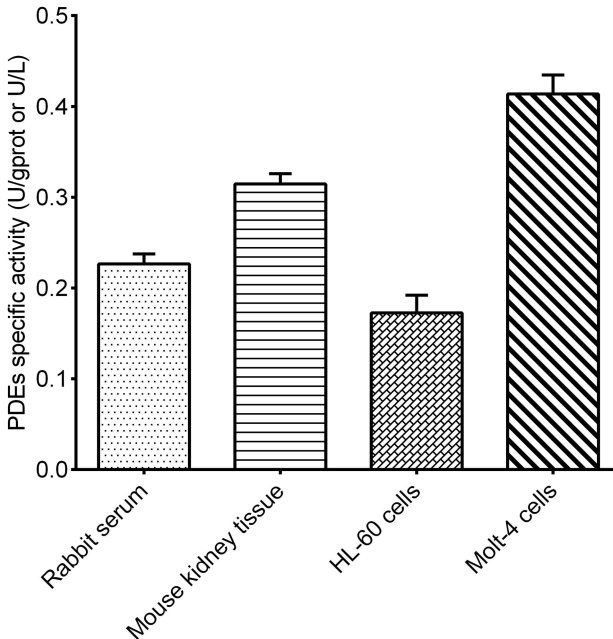
## 附录2 实例分析

例如检测HL-60细胞(数据仅供参考):

取20  $\mu\text{L}$  HL-60细胞匀浆上清液加入到酶标板孔内, 按操作表操作, 结果如下: 标准曲线:  $y = 0.9233x - 0.0039$ , 测定孔平均OD值为0.094, 对照孔平均OD值为0.074,  $1 \times 10^6$ 个HL-60细胞匀浆蛋白浓度为0.97 gprot/L, 计算结果为:

$$\begin{aligned}\text{总PDEs活力 (U/gprot)} &= (0.094 - 0.074 + 0.0039) \div 0.9233 \div 0.97 \div 60 \times 1000 \\ &= 0.44 \text{ U/gprot}\end{aligned}$$

按说明书操作, 测定兔血清(加样量20  $\mu\text{L}$ )、小鼠肾组织组织(10%组织匀浆蛋白浓度7.50 gprot/L, 加样量20  $\mu\text{L}$ )、 $1 \times 10^6$ 个HL-60细胞(蛋白浓度0.97 gprot/L, 加样量20  $\mu\text{L}$ )、 $1 \times 10^6$ 个Molt-4细胞(蛋白浓度0.39 gprot/L, 加样量20  $\mu\text{L}$ )中的总PDEs活力(如下图):



## 声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。





