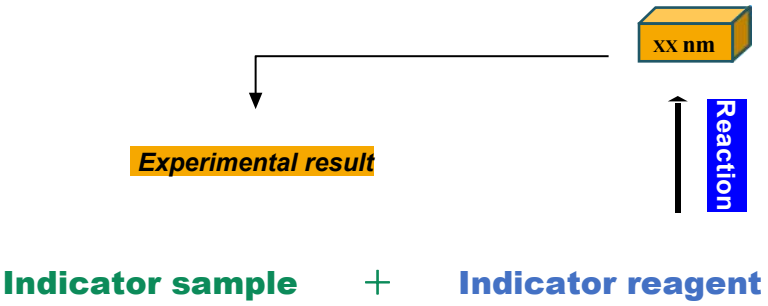
上海茁彩生物科技有限公司

Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

货号：ZC-S0496　　规格：100管/96样

磷脂酶 C（ Phospholipases C，PLC）试剂盒说明书

微量法

注意：正式测定之前选择*2-3*个预期差异大的样本做预测定。

测定意义

磷脂酶 C（EC3.1.4.3）是一种水解甘油磷酸酯C3位点甘油磷酸酯键的脂类水解酶，广泛存在于微生物及动植物的组织和细胞中，在细胞代谢、细胞传递、生长发育等方面具有重要作用。

测定原理

磷脂酶C催化水解NPPC产生对硝基苯酚，在410nm处有特征吸收峰。

自备实验用品及仪器

天平、研钵、超速冷冻离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板、恒温水浴锅。

试剂的组成和配制：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂一	液体 102mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂二	液体 10mL×1 瓶	4℃避光保存	-
试剂三	液体 8mL×1 瓶	4℃保存	-

酶液提取

1. 组织：按照质量（g）：提取液体积(mL)为1：5~10的比例（建议称取约0.1g，加入1mL提取液）加入提取液，冰浴匀浆后于4℃，10000g 离心5min，取全部上清于4℃、100000g离心 30min，弃上清，取沉淀溶于1mL试剂一。
2. 细胞：按照细胞数量（10^4个）：提取液体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细胞加入1mL提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率300w，超声3秒，间隔7秒，总时间3min）；然后于4℃，10000g 离心5min，取全部上清于4℃、100000g 离心30min，

弃上清，取沉淀溶于 1mL 试剂一。

3. 血清：直接测定。

测定操作

	空白管	测定管
样品（μL）		20
试剂一（μL）	20	
试剂二（μL）	100	100
充分混匀，37℃反应 30min		
试剂三（μL）	80	80
充分混匀，于微量石英比色皿/96 孔板，蒸馏水调零，测定 410nm 处吸光值，分别记为 A 空白管和 A 测定管，△A=A 测定管-A 空白管。		

酶活计算公式

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线：y=0.0191x-0.0103，R^2=0.9991

1. 按照蛋白浓度计算

酶活性定义：每毫克蛋白每分钟水解NPPC产生1nmol对硝基苯酚所需的酶量为一个酶活力单位。

PLC 活性（nmol/min/mg prot）=（△A+0.0103）÷ 0.0191×V 反总÷(V 样×Cpr) ÷T

= 125.5×（△A+0.0103）÷ Cpr

2. 按照样本质量计算

酶活性定义：每克组织每分钟水解NPPC产生1nmol对硝基苯酚所需的酶量为一个酶活力单位。

PLC 活性（nmol/min/g）=（△A+0.0103）÷ 0.0191×V 反总÷(V 样÷V 样总×W) ÷T

= 125.5×（△A+0.0103）÷ W

3. 按照细胞数量计算

酶活性定义：每10^4个细胞每分钟水解NPPC产生1nmol对硝基苯酚所需的酶量为一个酶活力单位。

PLC 活性（nmol/min/10^4cell）=（△A+0.0103）÷0.0191×V反总÷(V样÷V样总×细胞数量) ÷T

= 125.5×（△A+0.0103）÷ 细胞数量

4. 按照液体体积计算

酶活性定义：每毫升血清每分钟水解NPPC产生1nmol对硝基苯酚所需的酶量为一个酶活力单位。

PLC 活性（nmol/min/mL）=（△A+0.0103）÷ 0.0191×V 反总÷V 样÷T= 125.5×（△A+0.0103）

V 反总：反应总体积，0.2mL；V 样：加入样本体积，0.02mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；T：反应时间，30min

b. 用96孔板测定的计算公式如下

标准曲线：y =0.0191x-0.0103，R^2=0.9991

1. 按照蛋白浓度计算

酶活性定义：每毫克蛋白每分钟水解NPPC产生1nmol对硝基苯酚所需的酶量为一个酶活力单位。

PLC 活性（nmol/min/mg prot）=（△A+0.0103）÷ 0.0191×V 反总÷(V 样×Cpr) ÷T

= 251×（△A+0.0103）÷ Cpr

2. 按照样本质量计算

酶活性定义：每克组织每分钟水解 NPPC 产生1nmol对硝基苯酚所需的酶量为一个酶活力单位。

PLC 活性（nmol/min/g）=（△A+0.0103）÷ 0.0191×V 反总÷(V 样÷V 样总×W) ÷T

= 251×（△A+0.0103）÷ W

3. 按照细胞数量计算

酶活性定义：每10^4个细胞每分钟水解NPP产生1nmol对硝基苯酚所需的酶量为一个酶活力单位。

PLC 活性（nmol/min/10^4cell）=（△A+0.0103）÷ 0.0191×V 反总÷(V 样÷V 样总×细胞数量) ÷T= 251×（△A+0.0103）÷ 细胞数量

4. 按照液体体积计算

酶活性定义：每毫升血清每分钟水解NPPC产生1nmol对硝基苯酚所需的酶量为一个酶活力单位。

PLC 活性（nmol/min/mL）= （△A+0.0103）÷ 0.0191×V 反总÷V 样÷T= 251×（△A+0.0103）

V 反总：反应总体积，0.2mL；V 样：加入样本体积，0.02mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；T：反应时间，30min