

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

## 磷脂酶D (Phospholipases D, PLD) 试剂盒说明书

### 可见分光光度法

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。

产品内容：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体50mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂一	液体55mL×1 瓶	4℃避光保存	-
试剂二	液体8mL×1 瓶	4℃避光保存	-
试剂三	粉剂×1 瓶	-20℃避光保存	临用前加3mL无水乙醇充分溶解
试剂四	液体35mL×1 瓶	4℃避光保存	-
标准品	液体1mL×1 支	4℃避光保存	-

产品说明：

磷脂酶D (EC3. 1. 4. 4) 即磷脂酰胆碱水解酶，是催化磷酸二酯键水解和碱基交换反应的一类酶的总称，广泛存在于高等动植物和细菌等多种生物体中，具有参与胞脂质代谢、信号转导、生物膜形成的抗逆境胁迫等生理功能。

磷脂酶D催化水解磷脂酰胆碱末端的磷脂酰二酯键生成磷脂酸和胆碱，胆碱在胆碱氧化酶催化作用下生成甜菜碱和过氧化氢，过氧化氢在过氧化氢酶的作用下将4-氨基安替比林和重蒸酚氧化成粉红色物质，在500nm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、1 mL玻璃比色皿、恒温水浴锅，无水乙醇。

操作步骤：

一、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<sup>4</sup>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 s，间隔7 s，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。

## 二、测定操作

	空白管	标准管	测定管
试剂一 (mL)	0.1		
试剂二 (mL)	0.15	0.15	0.15
标准品 (mL)		0.1	
样品 (mL)			0.1
试剂三 (mL)	0.05	0.05	0.05
充分混匀, 30°C反应30min, 沸水浴10min, 打开盖子, 自然冷却 5min。			
试剂四 (mL)	0.7	0.7	0.7
30°C反应30min, 于1mL 玻璃比色皿, 空白管调零, 测定500nm 处吸光值, 分别记为A 标准管和A 测定管。			

## 三、酶活计算公式

### 1. 按照蛋白浓度计算

酶活性定义: 每毫克蛋白每分钟水解磷脂酰胆碱产生1nmol 胆碱所需的酶量一个酶活力单位 (U)。

$$\text{PLD活性 (U/mg prot)} = \text{A测定管/A标准管} \times \text{C标准} \div \text{Cpr} \div \text{T} = 0.017 \times (\text{A测定管/A标准管} \div \text{Cpr})$$

### 2. 按照样本质量计算

酶活性定义: 每毫克蛋白每分钟水解磷脂酰胆碱产生1nmol 胆碱所需的酶量一个酶活力单位 (U)。

$$\text{PLD活性 (U/g)} = \text{A测定管/A标准管} \times \text{C标准} \div \text{W} \div \text{T} = 0.017 \times (\text{A测定管/A标准管}) \div \text{W}$$

### 3. 按照细胞数量计算

酶活性定义: 每10<sup>4</sup>个细胞每分钟水解磷脂酰胆碱产生1nmol 胆碱所需的酶量一个酶活力单位 (U)。

$$\text{PLD活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = \text{A测定管/A标准管} \times \text{C标准} \div \text{细胞数量} \div \text{T} = 0.017 \times (\text{A测定管/A标准管}) \div \text{细胞数量}$$

### 4. 按照样本质量计算

酶活性定义: 每毫升血清每分钟水解磷脂酰胆碱产生1nmol 胆碱所需的酶量一个酶活力单位 (U)。

$$\text{PLD活性 (U/mL)} = \text{A测定管/A标准管} \times \text{C标准} \div \text{T} = 0.017 \times (\text{A测定管/A标准管})$$

C 标准: 标准品浓度, 500nmol/L; Cpr: 样品蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g/mL; T: 反应时间, 30min

## 注意事项:

1. 试剂三置于-20°C保存, 临用前配制, 配置好的试剂三置于4°C保存不超过7天。
2. 显色完成后, 若有沉淀, 于8000rpm, 25°C离心5min 后取上清测定。
3. 吸光值不宜超过1, 否则用试剂一将酶液进行稀释, 并在计算公式中乘以稀释倍数。