

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0495

Size: 100T/96S

磷脂酶 D (PLD) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

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, 具有参与细胞脂质代谢、信号传导、生物膜形成的抗逆境胁迫等生理功能。

二、测定原理:

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。

三、需自备的仪器和用品:

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、无水乙醇。

四、试剂的组成和配置:

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 × 瓶	4℃避光保存	
试剂二	液体 3mL × 1 瓶	4℃避光保存	
试剂三	粉剂 × 1 支	-20℃避光保存	临用前加 1mL 无水乙醇充分溶解
试剂四	液体 15mL × 1 瓶	4℃避光保存	
标准品	液体 1mL × 1 支	4℃避光保存	

五、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（10⁴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。

六、测定操作

	空白管	标准管	测定管
试剂一（μL）	20		
试剂二（μL）	30	30	30
标准品（μL）		20	
样品（μL）			20
试剂三（μL）	10	10	10
充分混匀，30℃反应 30min，沸水浴 1min，打开盖子，自然冷却 2min。			
试剂四（μL）	140	140	140
30℃反应 30min，于微量石英比色皿/96 孔板，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。			

七、酶活计算公式

- 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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 胆碱所需的酶量为一个酶活力单位。

PLD 活性 (nmol/min/mg prot) = A 测定管 ÷ A 标准管 × C 标准 ÷ Cpr ÷ T = 0.017 × A 测定管 ÷ A 标准管 ÷ Cpr

2. 按照样本质量计算

酶活性定义: 每克组织每分钟水解磷脂酰胆碱产生 1nmol 胆碱所需的酶量为一个酶活力单位。

PLD 活性 (nmol/min/g) = A 测定管 ÷ A 标准管 × C 标准 ÷ W ÷ T

= 0.017 × A 测定管 ÷ A 标准管 ÷ W

3. 按照细胞数量计算

酶活性定义: 每 10⁴ 个细胞每分钟水解磷脂酰胆碱产生 1nmol 胆碱所需的酶量为一个酶活力单位。

PLD 活性 (nmol/min/10⁴ cell) = A 测定管 ÷ A 标准管 × C 标准 ÷ 细胞数量 ÷ T

= 0.017 × A 测定管 ÷ A 标准管 ÷ 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磷脂酰胆碱产生 1nmol 胆碱所需的酶量为一个酶活力单位。

PLD 活性 (nmol/min/mL) = A 测定管 ÷ A 标准管 × C 标准 ÷ T = 0.017 × A 测定管 ÷ A 标准管

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

● 用 96 孔板测定的计算公式如下

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 胆碱所需的酶量为一个酶活力单位。

PLD 活性 (nmol/min/mg prot) = A 测定管 ÷ A 标准管 × C 标准 ÷ Cpr ÷ T

= 0.017 × A 测定管 ÷ A 标准管 ÷ Cpr

2. 按照样本质量计算

酶活性定义:每克组织每分钟水解磷脂酰胆碱产生 1nmol 胆碱所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLD 活性 (nmol/min/g)} = A_{\text{测定管}} \div A_{\text{标准管}} \times C_{\text{标准}} \div W \div T$$

$$= 0.017 \times A_{\text{测定管}} \div A_{\text{标准管}} \div W$$

3. 按照细胞数量计算

酶活性定义: 每 10^4 个细胞每分钟水解磷脂酰胆碱产生 1nmol 胆碱所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLD 活性 (nmol/min/10}^4\text{cell)} = A_{\text{测定管}} \div A_{\text{标准管}} \times C_{\text{标准}} \div \text{细胞数量} \div T$$

$$= 0.017 \times A_{\text{测定管}} \div A_{\text{标准管}} \div \text{细胞数量}$$

4. 按照液体体积计算

酶活性定义: 每毫升血清每分钟水解磷脂酰胆碱产生 1nmol 胆碱所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLD 活性 (nmol/min/mL)} = A_{\text{测定管}} \div A_{\text{标准管}} \times C_{\text{标准}} \div T = 0.017 \times A_{\text{测定管}} \div A_{\text{标准管}}$$

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

八、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。