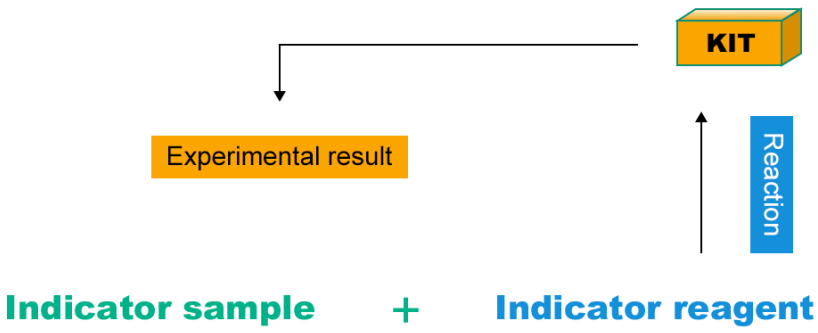
上海茁彩生物科技有限公司

ZCIBIO Technology Co.,Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO：ZC-S0497 Size：100T/48S

磷脂酶 A2（PLA2）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 A2（EC3.1.1.4）是磷脂 sn-2 位脂酰基水解酶，广泛存在于动植物组织、细菌、细胞核分泌物中，参与脂肪消化，精子成熟、细胞信号传递、脂质过氧化修复、宿主反应等生理过程，在控制体内磷脂类物质平衡、调节机体新陈代谢、参与疾病的病理进程等方面发挥着及其重要的作用。

二、测定原理：

磷脂酶 A2 作用于 2-硫代十六酰乙基磷酸胆碱（HEPC）产生游离巯基，与 DTNB 反应生成黄色物质，在 412nm 处有特征吸收峰。

三、需自备的仪器和用品：

天平、超速冷冻离心机、研钵、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板。

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 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体×5 瓶	-20℃避光保存	临用前根据用量每瓶加入 1.8mL 试剂二充分混匀。(3 天使用完)

五、样品处理

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。

六、测定操作

	对照管	测定管
样品（μL）	20	20
试剂二（μL）	180	
试剂三（μL）		180
充分混匀，37℃反应 10min，于微量石英比色皿/96 孔板，蒸馏水调零，测定 412nm 处吸光值，记为 A 对照管和 A 测定管，△A=A 测定管- A 对照管		

七、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 HEPC 产生 1nmol 游离巯基所需的酶量为一个酶活力单位。

PLA2 活性（nmol/min/mg prot）= △A÷（ε×d）×V 反总÷（V 样×Cpr）÷T

= 73.53×△A÷Cpr

2. 按照样本质量计算

酶活性定义:每克组织每分钟水解 HEPC 产生 1nmol 游离巯基所需的酶量为一个酶活力单位。

PLA2 活性（nmol/min/g）= △A÷（ε×d）×V 反总÷（W×V 样÷V 样总）÷T

= 73.53×△A÷W

3. 细胞数量计算

酶活性定义:每 10^4 个细胞每分钟水解 HEPC 产生 1nmol 游离巯基所需的酶量为一个酶活力单位。

PLA2 活性（nmol/min/10^4cell）= △A÷（ε×d）×V 反总÷（V 样×细胞数量÷V 样总）÷T= 73.53×△A÷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 HEPC 产生 1nmol 游离巯基所需的酶量为一个酶活力单位。

PLA2 活性（nmol/min/mL）= △A÷（ε×d）×V 反总÷V 样÷T= 73.53×△A

ε：TNB 消光系数，13600L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 反总：反应总体积，1mL；V 样：反应体系中加入样本体积，0.1mL；W：样本质量，g；V 样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，10min

- **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 HEPC 产生 1nmol 游离巯基所需的酶量为一个酶活力单位。

PLA2 活性（nmol/min/mg prot）= △A÷（ε×d）×V 反总÷（V 样×Cpr）÷T

=147.06×△A÷Cpr

2. 按照样本质量计算

酶活性定义:每克组织每分钟水解 HEPC 产生 1nmol 游离巯基所需的酶量为一个酶活力单位。

PLA2 活性（nmol/min/g）= （ε×d）×V 反总÷（W×V 样÷V 样总）÷T= 147.06×△A÷W

3. 细胞数量计算

酶活性定义：每 10^4 个细胞每分钟水解 HEPC 产生 1nmol 游离巯基所需的酶量为一个酶活力单位。

PLA2 活性（nmol/min/10^4cell）= △A÷（ε×d）×V 反总÷（V 样×细胞数量÷V 样总）÷T=147.06×△A÷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 HEPC 产生 1nmol 游离巯基所需的酶量为一个酶活力单位。

PLA2 活性（nmol/min/mL）= △A÷（ε×d）×V 反总÷V 样÷T= 147.06×△A

ε：TNB 消光系数，13600L/mol/cm；d：比色皿光径，0.5cm；V 反总：反应总体积，1mL；V 样：反应体系中加入样本体积，0.1mL；W：样本质量，g；V 样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，10min