

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-S0776

Size: 50T/48S

磷脂酶 D (PLD) 检测试剂盒说明书

可见分光光度法

*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。

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、1 mL玻璃比色皿、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 50mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 55mL × 1 瓶	4°C 避光保存	
试剂二	液体 8mL × 1 瓶	4°C 避光保存	
试剂三	粉剂 × 1 瓶	-20°C 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°C 避光保存	
标准品	液体 1mL × 1 支	4°C 避光保存	

五、操作步骤：

● 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°C, 10000g 离心 5min, 取全部上清于 4°C, 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 s, 间隔 7 s, 总时间 3min); 然后于 4°C, 10000g 离心 5min, 取全部上清于 4°C、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	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。			

六、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10⁴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)。

PLD 活性 (U/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)。

PLD 活性 (U/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； C_{pr}：样品蛋白浓度，mg/mL； W：样本质量，g/mL；
T：反应时间，30min

七、注意事项：

1. 试剂三置于-20℃保存，临用前配制，配置好的试剂三置于4℃保存不超过7天。
2. 显色完成后，若有沉淀，于8000rpm，25℃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。