

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-S0777

Size: 50T/48S

磷脂酶 C (PLC) 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C (EC 3. 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。

二、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。

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、1mL玻璃比色皿、恒温水浴锅。

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℃保存	
试剂一	液体 55mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 25mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4℃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°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 (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°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。

六、测定操作

	空白管	测定管
样品 (μL)		100
试剂一 (μL)	100	
试剂二 (μL)	500	500
充分混匀, 37°C 反应 30min		
试剂三 (μL)	400	400
充分混匀, 于 1mL 玻璃比色皿, 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, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。		

七、酶活计算公式

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。

$$\begin{aligned} \text{PLC活性 (nmol/min/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0103) \div 0.0191 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 125.5 \times (\Delta A + 0.0103) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{PLC活性 (nmol/min/g)} &= (\Delta A + 0.0103) \div 0.0191 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 125.5 \times (\Delta A + 0.0103) \div W \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{PLC活性 (nmol/min}/10^4\text{cell)} &= (\Delta A + 0.0103) \div 0.0191 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \\ &\div T = 125.5 \times (\Delta A + 0.0103) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

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。

$$\text{PLC活性 (nmol/min/mL)} = (\Delta A + 0.0103) \div 0.0191 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 125.5 \times (\Delta A + 0.0103)$$

V反总: 反应总体积, 1mL; V样: 加入样本体积, 0.1mL; 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