

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-S0778

Size: 50T/24S

磷脂酶 A2 (PLA2) 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、可见分光光度计、1 mL 玻璃比色皿。

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 50mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 50mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液体×5 瓶	-20°C避光保存	临用前根据用量每瓶加入 4.5mL 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°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

	对照管	测定管
样品 (μL)	100	100
试剂二 (μL)	900	
试剂三 (μL)		900
充分混匀, 37°C 反应 10min, 于 1mL 玻璃比色皿, 蒸馏水调零, 测定 412nm 处吸光值, 记为 A 对照管和 A 测定管, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$		

七、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 HEPC 产生 1nmol 游离巯基所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLA2 活性 (nmol/min/mg prot)} = \Delta A \div (e \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$$

$$= 73.53 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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。

$$\text{PLA2 活性 (nmol/min/g)} = \Delta A \div (e \times d) \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 73.53 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\text{PLA2活性 (nmol/min/10}^4\text{cell)} = \Delta A \div (e \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 73.53 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

4. 按照液体体积计算

酶活性定义: 每毫升血清每分钟水解HEPC产生1nmol 游离巯基所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLA2活性 (nmol/min/mL)} = \Delta A \div (e \times d) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 73.53 \times \Delta A$$

e: 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