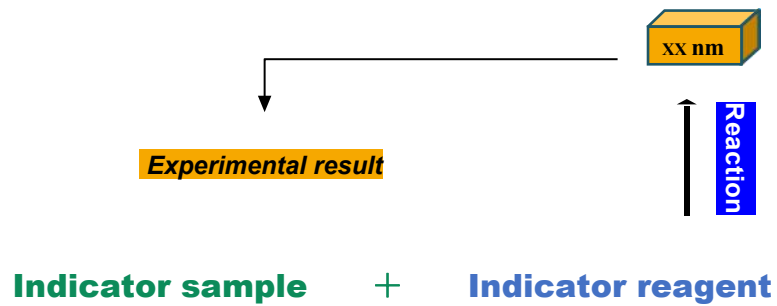


上海茁彩生物科技有限公司  
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

## 磷脂酶C (PLC) 检测试剂盒说明书

### 可见分光光度法

**注意：**正式测定之前选择 2-3个预期差异大的样本做预测定。

#### 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。

#### 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。

#### 自备实验用品及仪器

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。

#### 试剂组成和配制

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	-

#### 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 (10<sup>4</sup>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。

#### 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℃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， $\Delta A = A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}$ 。		

### 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。

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

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