

磷脂（PLIP）（氧化酶法）含量检测试剂盒

（货号：ADS-W-D034 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

磷脂在磷脂酶 D 的作用水解生成胆碱和磷脂酸，胆碱被胆碱氧化酶氧化生成过氧化氢，过氧化氢与 4-氨基安替比林、DAOS 反应生成蓝色染料。此染料在 600nm 有最大吸收峰，吸收强度与样本中磷脂含量成正比。

二、试剂盒组分与配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 18mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	液体 5mL×1 瓶	4℃避光保存	
标准管	粉剂 1 支	4℃避光保存	每支： 1. 临用前 8000g 4℃离 2min 使试剂落入管底； 2. 加 0.2ml 蒸馏水，一周内用完，配成的浓度见标签。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、天平、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

① 组织样本：

取约 0.1g 组织，加入 1mL 无水乙醇，进行冰浴匀浆。4℃×12000rpm 离心 5min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：无水乙醇体积（mL）为 1：5~10 的比例进行提取。

② 液体样本：澄清的液体可直接检测；若浑浊则离心后取上清液检测。

③ 新鲜血清或肝素抗凝血浆。当样本中抗坏血酸≤50mg/dL、直接胆红素≤40mg/dL、总胆红素≤40mg/dL、溶血≤400mg/dL、乳糜≤1.60%时未观察到明显干扰。

④ 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 无水乙醇，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4℃离心 5min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10⁴）：无水乙醇（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min（等待仪器过自检程序亦可），设定波长到 600nm。

② 所有试剂解冻至室温，在 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)	标准管 (仅做一次)
样本	2		
蒸馏水		2	
标准品			2
试剂一	160	160	160
混匀, 37°C 孵育 3min 后, 于 600nm 处读取 A1。			
试剂二	40	40	40
混匀, 37°C 孵育 5min 后, 于 600nm 处读取 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。			

【注】：若 ΔA 值小于 0.005, 可增加样本加样体积 V1 (如由 2μL 增至 5μL, 空白管也由 2μL 增至 5μL 蒸馏水, 标准管仍然为 2μL+3μL 蒸馏水 (总体积同测定管和空白管即 5μL) ; 其他试剂均保持不变), 则改变后的 V1 代入公式重新计算。

五、结果计算:

1、按组织质量计算:

$$\begin{aligned} \text{磷脂 (PLIP) (mmol/g)} &= (C_{\text{标准}} \times V2) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div (V1 \div V \times W) \times D \\ &= C_{\text{标准}} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div W \times D \end{aligned}$$

2、按蛋白浓度计算:

$$\begin{aligned} \text{磷脂 (PLIP) (mmol/mg prot)} &= (C_{\text{标准}} \times V2) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div (V1 \div V \times Cpr) \times D \\ &= C_{\text{标准}} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

3、按照体积计算:

$$\begin{aligned} \text{磷脂 (PLIP) (mmol/L)} &= (C_{\text{标准}} \times V2) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div V1 \times D \\ &= C_{\text{标准}} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \times D \end{aligned}$$

4 按细胞数量计算:

$$\begin{aligned} \text{磷脂 (PLIP) (mmol/10}^4 \text{ cell)} &= (C_{\text{标准}} \times V2) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div (500 \times V1 \div V) \times D \\ &= C_{\text{标准}} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div 500 \times D \end{aligned}$$

C 标准---标品浓度, 见标签; V1---加入样本体积, 0.002mL;

V2---加入标准品体积, 0.002mL; D---稀释倍数, 未稀释即为 1。

V---无水乙醇体积, 1mL W---样本取样质量, g

500---细菌/细胞数量, 万

Cpr---上清液蛋白浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒