

磷脂酶 D (Phospholipases D, PLD) 活性测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-ZF017-50 微板法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

磷脂酶 D (EC 3.1.4.4) 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, 具有参与细胞脂质代谢、信号传导、生物膜形成的抗逆境胁迫等生理功能。

磷脂酶 D 催化水解底物 O-(4-硝基苯基)胆碱 (NPPC), 并在外加酸性磷酸酶的作用下产生对硝基苯酚(PNP), 该产物在 405nm 处有最大吸收峰。通过检测 PNP 在 405nm 下的增加速率, 即可得到 PLC 酶活性大小。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃避光保存	1. 用前摇匀再用; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂一	粉剂 2 支	-20℃避光保存	每支: 1. 临用前 8000g 4℃离心 2min 使试剂落入管底(可手动甩一甩); 2. 每支加 0.3mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂-20℃保存。
试剂二	粉剂 2 支	-20℃避光保存	每支: 1. 临用前 8000g 4℃离心 2min 使试剂落入管底(可手动甩一甩); 2. 加入 1.2mL 蒸馏水溶解且 5000rpm 离心 5min, 取上清液备用; 3. 用不完的上清液-20℃保存。
试剂三	液体 14mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 2.5mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂 1 支	4℃避光保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、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 (水分充足的果实样本可取 0.2-0.3g), 加入 1mL 提取液 (用

前摇匀再用)，进行冰浴匀浆，13000rpm，4℃离心15min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量(g)：提取液体积(mL)为1：5~10的比例提取。

- ② 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提取液，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）；13000rpm 4℃离心15min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量(10^4)：提取液(mL)为500~1000：1的比例进行提取。

2、检测步骤：

- ① 酶标仪预热30min，调节波长到405nm，所有试剂解冻至室温（25℃）。
② 在96孔板中依次加入：

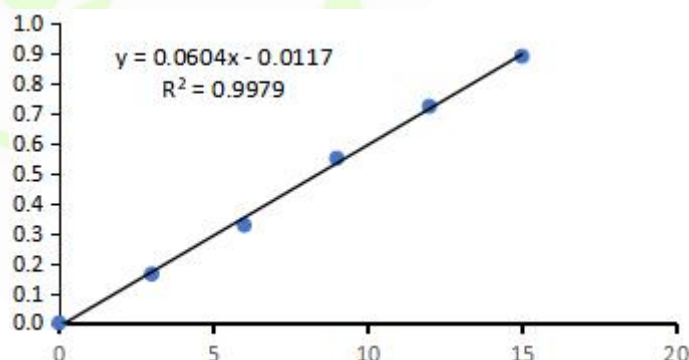
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	30	30
试剂一	10	
试剂二	20	20
试剂三	120	130
混匀，37℃孵育反应30min。		
试剂四	20	20
混匀，于405nm处读取吸光值A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本需做一个自身对照)。		

【注】：① 若 ΔA 的值小于0.01，可增加样本量V1（如增至60μL，则试剂三相应减少）或延长反应时间T（如增至60min或更长），则改变后的V1和T须代入公式重新计算。

② 若 ΔA 的值超过1，可减少样本量V1（如减至10μL，则试剂三相应增加）或缩短反应时间T（如减至10min）；或对最终的待检液用蒸馏水稀释，则改变后的V1和T和稀释倍数D代入计算公式；

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 0.0604x - 0.0117$ ，x是PNP摩尔质量(nmol)，y是 ΔA 。



2、按照样本蛋白浓度计算：

酶活定义：37℃中每毫克蛋白每分钟水解1nmol NPPC产生PNP定义为1个酶活单位。

$$PLD (\text{nmol/min/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0117) \div 0.0604] \div (C_{pr} \times V_1) \div T \times D = 18.4 \times (\Delta A + 0.0117) \div C_{pr} \times D$$

3、按照样本质量计算：

酶活定义：37℃中每克组织每分钟水解1nmol NPPC产生PNP定义为1个酶活单位。

$$PLD (\text{nmol/min/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0117) \div 0.0604] \div (W \times V_1 \div V) \div T \times D = 18.4 \times (\Delta A + 0.0117) \div W \times D$$

4、按细菌/细胞数量计算：

酶活定义：每 10^4 个细胞每分钟水解1nmol NPPC产生PNP定义为1个酶活单位。

$$PLD (\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0117) \div 0.0604] \div (500 \times V_1 \div V) \div T \times D = 0.04 \times (\Delta A + 0.0117) \times D$$

5、按液体体积计算：

酶活定义：37℃中每毫升液体每分钟水解 1nmol NPPC 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$PLD \text{ (nmol/min/mL)} = [(\Delta A + 0.0117) \div 0.0604] \div V1 \div T \times D = 18.4 \times (\Delta A + 0.0117) \times D$$

V---提取液体积，1 mL； V1---加入反应体系中上清液体积（mL），0.03mL；
T---反应时间（min），30 min； D---稀释倍数，未稀释即为 1；
W ---样品质量，g； 500---细胞数量；
Cpr---粗酶液蛋白质浓度（mg/mL），建议使用本公司的 BCA 蛋白质含量测定试剂盒；

附：标准曲线制作过程：

1 向标准品 EP 管里面加入 1.4ml 蒸馏水超声溶解，标准品母液浓度为 10 μ mol/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 μ mol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 50uL，加入 950uL 蒸馏水，混匀得到 0.5 μ mol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μ mol/mL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据以下加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称（ μ L）	标准管	0 浓度管（仅做一次）
标品	30	
蒸馏水		30
试剂三	150	150
试剂四	20	20
混匀，于 405nm 处读值， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		