

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

(货号: BP10191F 分光法 24 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 30mL×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° C 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 1 支	-20℃避光保存	1. 临用前 8000g 4° C 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。 用不完的上清液-20℃保存。
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 4mL×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)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、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 分光光度计预热 30min，调节波长到 405nm，蒸馏水调零。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃），在 EP 管中依次加入：

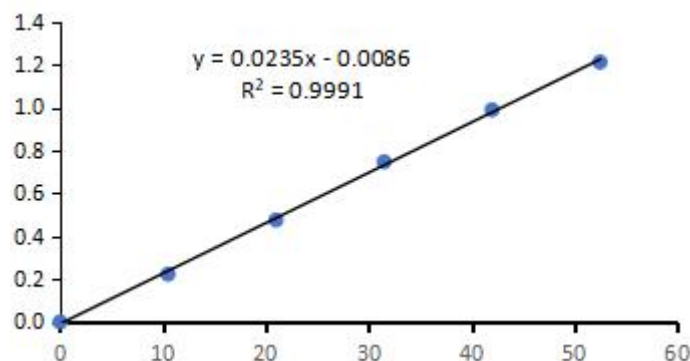
试剂组分（μL）	测定管	对照管
样本	105	105
试剂一	20	
试剂二	20	20
试剂三	485	505
混匀，37℃孵育反应 30min。		
试剂四	70	70
混匀，取全部液体至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 405nm 处读吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本需做一个自身对照）。		

【注】：① 若 ΔA 的值小于 0.01，可增加样本量 V_1 （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 V_1 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 V_1 （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 V_1 和 T 和稀释倍数 D 代入计算公式；

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 0.0235x - 0.0086$ ， 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。

$$\text{PLD (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0086) \div 0.0235] \div (\text{Cpr} \times V_1) \div T \times D = 13.5 \times (\Delta A + 0.0086) \div \text{Cpr} \times D$$

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。

$$\text{PLD (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0086) \div 0.0235] \div (W \times V_1 \div V) \div T \times D = 13.5 \times (\Delta A + 0.0086) \div W \times D$$

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。

$$\text{PLD (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0086) \div 0.0235] \div (500 \times V_1 \div V) \div T \times D = 0.027 \times (\Delta A + 0.0086) \times D$$

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。

$$\text{PLD (nmol/min/mL)} = [(\Delta A + 0.0086) \div 0.0235] \div V_1 \div T \times D = 13.5 \times (\Delta A + 0.0086) \times D$$

V---提取液体积, 1 mL; V1---加入反应体系中上清液体积 (mL), 0.105mL;
 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	105	
蒸馏水		105
试剂三	525	525
试剂四	70	70
混匀取全部液体至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 于 405nm 处读值, $\Delta A=A$ 测定-0 浓度管。		