

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

(货号: G0925W 微板法 48 样)

一、产品简介:

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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存	用前摇匀再用。
试剂一	粉剂 mg×2 支	-20℃ 保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 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 mg×1 支	-20℃ 保存	用前甩几下使粉剂落入底部, 加 2.4mL 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 14mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	液体 2.5mL×1 支	4℃ 保存	
标准品	粉剂×1 支	4℃ 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、低温离心机、水浴锅或恒温培养箱、可调式移液器和蒸馏水。

四、磷脂酶 D (PLD) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

- 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、上机检测:

- 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:

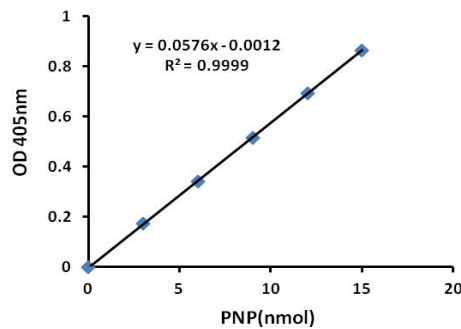
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	30	30
试剂一	10	
试剂二	20	20

试剂三	120	130
混匀, 37°C 孵育反应 30min。		
试剂四	20	20
混匀, 于 405nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A$ 测定-A 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 60 μ L, 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 10 μ L, 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: $y = 0.0576x - 0.0012$, 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°C 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。

$$PLD (\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0012) \div 0.0576] \div (C_{pr} \times V1) \div T \times D = 19.3 \times (\Delta A + 0.0012) \div C_{pr} \times D$$

3、按照样本质量计算:

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

$$PLD (\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0012) \div 0.0576] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 19.3 \times (\Delta A + 0.0012) \div W \times D$$

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。

$$PLD (\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0012) \div 0.0576] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D = 0.04 \times (\Delta A + 0.0012) \times D$$

5、按液体体积计算:

酶活定义: 37°C 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。

$$PLD (\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0012) \div 0.0576] \div V1 \div T \times D = 19.3 \times (\Delta A + 0.0012) \times D$$

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 制备标准品母液 (10 μ mol/mL): 向标准品 EP 管里面加入 1.4ml 蒸馏水超声溶解。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品: 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 μ mol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 在 96 孔板中依次加入: 30 μ L 标准品+150 μ L 试剂三+20 μ L 试剂四, 混匀于 405nm 处读值, 根据结果即可制作标准曲线。