

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

(货号: G0925F 分光法 24 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 30mL×1 瓶	4°C 保存	使用前摇匀再用。
试剂一	粉剂 mg×2 支	-20°C 保存	使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°C 保存。
试剂二	粉剂 mg×1 支	-20°C 保存	使用前甩几下使粉剂落入底部, 加 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°C 保存。
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂四	液体 4mL×1 支	4°C 保存	
标准品	粉剂×1 支	4°C 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、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 (使用前摇匀再用), 进行冰浴匀浆, 13000rpm, 4°C 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°C 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 可见分光光度计预热 30min, 调节波长到 405nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C), 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	105	105
试剂一	20	

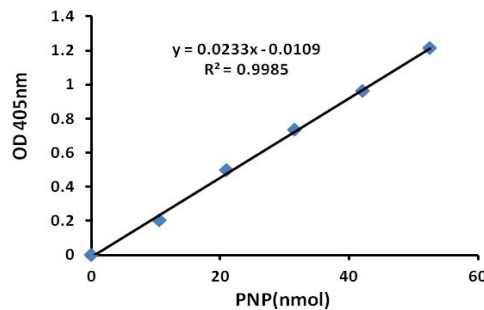
试剂二	20	20
试剂三	485	505
混匀，37℃孵育反应 30min。		
试剂四	70	70
混匀，取全部液体至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 405nm 处读吸光值 A， $\Delta A=A$ 测定-A 对照(每个样本需做一个自身对照)。		

【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： $y = 0.0233x - 0.0109$ ，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。

$$PLD (\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0109) \div 0.0233] \div (Cpr \times V1) \div T \times D = 13.6 \times (\Delta A + 0.0109) \div Cpr \times D$$

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。

$$PLD (\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0109) \div 0.0233] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 13.6 \times (\Delta A + 0.0109) \div W \times D$$

4、按细菌/细胞数量计算：

酶活定义：每 10⁴ 个细胞每分钟水解 1nmol NPPC 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$PLD (\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0109) \div 0.0233] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D = 0.03 \times (\Delta A + 0.0109) \times D$$

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。

$$PLD (\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0109) \div 0.0233] \div V1 \div T \times D = 13.6 \times (\Delta A + 0.0109) \times D$$

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 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 EP 管中依次加入：105 μ L 标准品+525 μ L 试剂三+70 μ L 试剂四，混匀取全部液体至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 405nm 处读值，根据结果即可制作标准曲线。