

磷脂酶 D (Phospholipases D, PLD) 试剂盒说明书

微量法 100T/96S

注 意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

磷脂酶 D (EC3.1.4.4) 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。

测定原理：

磷脂酶 D 催化水解磷脂酰胆碱末端的磷脂酰二酯键生成磷脂酸和胆碱，胆碱在胆碱氧化酶催化作用下生成甜菜碱和过氧化氢，过氧化氢在过氧化氢酶的作用下将 4-氨基安替比林和重蒸酚氧化成粉红色物质，在 500nm 处有特征吸收峰。

自备实验用品及仪器：

天平、研钵、超速冷冻离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、恒温水浴锅、无水乙醇。

试剂组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 102mL×瓶，4℃ 避光保存。

试剂二：液体 3mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

试剂三：粉剂×1 支，-20℃ 避光保存。临用前加 1mL 无水乙醇充分溶解；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融。

试剂四：液体 15mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

标准品：液体 1mL×1 支，4℃ 避光保存。

酶液提取：

1. 组织：按照质量 (g)：提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g，加入 1mL 提取液)加入提取液，冰浴匀浆后于 4℃，10000g 离心 5min，取全部上清于 4℃、100000g 离心 30min，弃上清，取沉淀溶于 1mL 试剂一。
2. 细胞：按照细胞数量 (10⁴ 个)：提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL 提取液)，冰浴超声波破碎细胞 (功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min)；然后于 4℃，10000g 离心 5min，取全部上清于 4℃、100000g 离心 30min，弃上清，取沉淀溶于 1mL 试剂一。
3. 血清：直接测定。

测定操作：

	空白管	标准管	测定管
--	-----	-----	-----

试剂一 (μL)	20		
试剂二 (μL)	30	30	30
标准品 (μL)		20	
样品 (μL)			20
试剂三 (μL)	10	10	10
充分混匀, 30℃反应 30min, 沸水浴 1min, 打开盖子, 自然冷却 2min。			
试剂四 (μL)	140	140	140
30℃反应 30min, 于微量石英比色皿/96 孔板, 空白管调零, 测定 500nm 处吸光值, 分别记为 A 标准管和 A 测定管。			

酶活计算公式

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 按照蛋白浓度计算

酶活性定义: 每毫克蛋白每分钟水解磷脂酰胆碱产生 1nmol 胆碱所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLD 活性 (nmol/min /mg prot)} = \frac{A_{\text{测定管}}}{A_{\text{标准管}}} \times C_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}} \div T = 16.7 \times \frac{A_{\text{测定管}}}{A_{\text{标准管}}} \div C_{\text{pr}}$$

2. 按照样本质量计算

酶活性定义: 每克组织每分钟水解磷脂酰胆碱产生 1nmol 胆碱所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLD 活性 (nmol/min /g 鲜重)} = \frac{A_{\text{测定管}}}{A_{\text{标准管}}} \times C_{\text{标准}} \div W \div T = 16.7 \times \frac{A_{\text{测定管}}}{A_{\text{标准管}}} \div W$$

3. 按照细胞数量计算

酶活性定义: 每 10⁴ 个细胞每分钟水解磷脂酰胆碱产生 1nmol 胆碱所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLD 活性 (nmol/min /10}^4 \text{ cell)} = \frac{A_{\text{测定管}}}{A_{\text{标准管}}} \times C_{\text{标准}} \div \text{细胞数量} \div T = 16.7 \times \frac{A_{\text{测定管}}}{A_{\text{标准管}}} \div \text{细胞数量}$$

4. 按照液体体积计算

酶活性定义: 每毫升血清每分钟水解磷脂酰胆碱产生 1nmol 胆碱所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLD 活性 (nmol/min /mL)} = \frac{A_{\text{测定管}}}{A_{\text{标准管}}} \times C_{\text{标准}} \div T = 16.7 \times \frac{A_{\text{测定管}}}{A_{\text{标准管}}}$$

C 标准 标准品浓度, 500nmol/mL; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g/mL; T: 反应时间, 30min

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

1. 按照蛋白浓度计算

酶活性定义: 每毫克蛋白每分钟水解磷脂酰胆碱产生 1nmol 胆碱所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLD 活性 (nmol/min /mg prot)} = \frac{A_{\text{测定管}}}{A_{\text{标准管}}} \times C_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}} \div T = 16.7 \times \frac{A_{\text{测定管}}}{A_{\text{标准管}}} \div C_{\text{pr}}$$

2. 按照样本质量计算

酶活性定义: 每克组织每分钟水解磷脂酰胆碱产生 1nmol 胆碱所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLD 活性 (nmol/min /g 鲜重)} = \frac{A_{\text{测定管}}}{A_{\text{标准管}}} \times C_{\text{标准}} \div W \div T = 16.7 \times \frac{A_{\text{测定管}}}{A_{\text{标准管}}} \div W$$

3. 按照细胞数量计算

酶活性定义：每 10⁴ 个细胞每分钟水解磷脂酰胆碱产生 1nmol 胆碱所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLD 活性 (nmol/min /10}^4 \text{ cell)} = \frac{A_{\text{测定管}}}{A_{\text{标准管}}} \times C_{\text{标准}} \div \text{细胞数量} \div T = 16.7 \times \frac{A_{\text{测定管}}}{A_{\text{标准管}}} \div \text{细胞数量}$$

4. 按照液体体积计算

酶活性定义：每毫升血清每分钟水解磷脂酰胆碱产生 1nmol 胆碱所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLD 活性 (nmol/min /mL)} = \frac{A_{\text{测定管}}}{A_{\text{标准管}}} \times C_{\text{标准}} \div T = 16.7 \times \frac{A_{\text{测定管}}}{A_{\text{标准管}}}$$

C 标准 标准品浓度, 500nmol/mL; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g/mL; T: 反应时间, 30min

注意事项：

1. 显色完成后, 若有沉淀, 于 8000rpm, 25℃离心 5min 后取上清测定。
2. 吸光值不宜超过 1, 否则用试剂一将酶液进行稀释, 并在计算公式中乘以稀释倍数。