

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°C反应30min, 沸水浴1min, 打开盖子, 自然冷却2min。			
试剂四 (μL)	140	140	140
30°C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。

$$\text{PLD活性 (nmol/min /mg prot)} = \frac{\boxed{} \times \text{C标准}}{\text{Cpr} \div \text{T}} = 16.7 \times \frac{\boxed{}}{\text{Cpr}}$$

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。

$$\text{PLD活性 (nmol/min /g 鲜重)} = \frac{\boxed{} \times \text{C标准}}{\text{W} \div \text{T}} = 16.7 \times \frac{\boxed{}}{\text{W}}$$

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。

$$\text{PLD活性 (nmol/min /104 cell)} = \frac{\boxed{} \times \text{C标准}}{\text{细胞数量} \div \text{T}} = 16.7 \times \frac{\boxed{}}{\text{细胞数量}}$$

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。

$$\text{PLD活性 (nmol/min /mL)} = \frac{\boxed{} \times \text{C标准}}{\text{T}} = 16.7 \times \frac{\boxed{}}{\text{T}}$$

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。

$$\text{PLD活性 (nmol/min /mg prot)} = \frac{\boxed{} \times \text{C标准}}{\text{Cpr} \div \text{T}} = 16.7 \times \frac{\boxed{}}{\text{Cpr}}$$

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。

$$\text{PLD活性 (nmol/min /g 鲜重)} = \boxed{} \times \text{C标准} \div \text{W} \div \text{T} = 16.7 \times \boxed{} \div \text{W}$$

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。

$$\text{PLD活性 (nmol/min /104 cell)} = \boxed{} \times \text{C标准} \div \text{细胞数量} \div \text{T} = 16.7 \times \boxed{} \div \text{细胞数量}$$

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。

$$\text{PLD活性 (nmol/min /mL)} = \boxed{} \times \text{C标准} \div \text{T} = 16.7 \times \boxed{}$$

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°C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。