

## 磷脂酶C ( Phospholipases C, PLC ) 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C (EC3.1.4.3) 是一种水解甘油磷酸酯C3位点甘油磷酸酯键的脂类水解酶，广泛存在于微生物及动植物的组织和细胞中，在细胞代谢、细胞传递、生长发育等方面具有重要作用。

### 测定原理

磷脂酶C催化水解NPPC产生对硝基苯酚，在410nm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。

### 试剂组成和配制

提取液：液体100mL×1瓶，4°C保存。

试剂一：液体102mL×1瓶，4°C保存。

试剂二：液体10mL×1瓶，4°C避光保存。

试剂三：液体8mL×1瓶，4°C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°C，10000g离心5min，取全部上清于4°C、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 (10<sup>4</sup>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°C，10000g离心5min，取全部上清于4°C、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 | 测定管 |
|--|-----|-----|
| 样品 (μL)  |     | 20  |
| 试剂一 (μL)   | 20  |     |
| 试剂二 (μL)   | 100 | 100 |
| 充分混匀，37°C反应30min   |     |     |
| 试剂三 (μL)   | 80  | 80  |
| 充分混匀，于微量石英比色皿/96孔板，蒸馏水调零，测定410nm处吸光值，分别记为A空白管和A测定管， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。 |     |     |

## 酶活计算公式

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线:  $y = 0.0191x - 0.0103$ ,  $R^2 = 0.9991$

1. 按照蛋白浓度计算

**酶活性定义:** 每毫克蛋白每分钟水解NPPC产生1nmol对硝基苯酚所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{PLC活性 (nmol/min/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0103) \div 0.0191 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 17.45 \times (\Delta A + 0.0103) \div C_{\text{pr}}\end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

**酶活性定义:** 每克组织每分钟水解NPPC产生1nmol对硝基苯酚所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{PLC活性 (nmol/min/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.0103) \div 0.0191 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 17.45 \times (\Delta A + 0.0103) \div W\end{aligned}$$

3. 按照细胞数量计算

**酶活性定义:** 每104个细胞每分钟水解NPPC产生1nmol对硝基苯酚所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{PLC活性 (nmol/min/104 cell)} &= (\Delta A + 0.0103) \div 0.0191 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \div T \\ &= 17.45 \times (\Delta A + 0.0103) \div \text{细胞数量}\end{aligned}$$

4. 按照液体体积计算

**酶活性定义:** 每毫升血清每分钟水解NPPC产生1nmol对硝基苯酚所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{PLC活性 (nmol/min/mL)} &= (\Delta A + 0.0103) \div 0.0191 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 17.45 \times (\Delta A + 0.0103)\end{aligned}$$

$V_{\text{反总}}$ : 反应总体积, 0.2mL;  $V_{\text{样}}$ : 加入样本体积, 0.02mL;  $V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积, 1mL;  $C_{\text{pr}}$ : 样本蛋白浓度, mg/mL;  $W$ : 样本质量, g;  $T$ : 反应时间, 30min

b. 用96孔板测定的计算公式如下

标准曲线:  $y = 0.0095x - 0.0103$ ,  $R^2 = 0.9991$

1. 按照蛋白浓度计算

**酶活性定义:** 每毫克蛋白每分钟水解NPPC产生1nmol对硝基苯酚所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{PLC活性 (nmol/min/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0103) \div 0.0095 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 35.09 \times (\Delta A + 0.0103) \div C_{\text{pr}}\end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

**酶活性定义:** 每克组织每分钟水解NPPC产生1nmol对硝基苯酚所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{PLC活性 (nmol/min/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.0103) \div 0.0095 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 35.09 \times (\Delta A + 0.0103) \div W\end{aligned}$$

3. 按照细胞数量计算

**酶活性定义:** 每104个细胞每分钟水解NPPC产生1nmol对硝基苯酚所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{PLC活性 (nmol/min/104 cell)} &= (\Delta A + 0.0103) \div 0.0095 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \div T \\ &= 35.09 \times (\Delta A + 0.0103) \div \text{细胞数量}\end{aligned}$$

#### 4. 按照液体体积计算

**酶活性定义：**每毫升血清每分钟水解NPPC产生1nmol对硝基苯酚所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{PLC活性 (nmol/min/mL)} &= (\Delta A + 0.0103) \div 0.0095 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 35.09 \times (\Delta A + 0.0103)\end{aligned}$$

V反总：反应总体积，0.2mL； V样：加入样本体积，0.02mL； V样总：加入提取液体积，1mL； Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL； W：样本质量，g； T：反应时间，30min