



磷脂酶 D 活性检测试剂盒 PLD Assay Kit

微量法

产品编号: AK485M
产品规格: 100T/96S
产品组成及保存条件:

| 编号 | 规格 | 储存条件 |
|---------|-----------|--|
| ES485 | 100mL×1 瓶 | 4℃保存; |
| AK485-A | 102mL×瓶 | 4℃避光保存; |
| AK485-B | 3mL×1 瓶 | 4℃避光保存; |
| AK485-C | 粉剂×1 支 | -20℃避光保存。临用前加1mL无水乙醇充分溶解; 剩余试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融。 |
| AK485-D | 15mL×1 瓶 | 4℃避光保存; |
| AK485-S | 1mL×1 支 | (标准品) 4℃避光保存; |

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 磷脂酶 D (Phospholipases D, PLD; 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。

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。

自备用品:

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

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 ES485) 加入 ES485, 冰浴匀浆后于 4℃, 10000g 离心 5min, 取全部上清于 4℃、10000g 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 ES485), 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℃、10000g 离心 30min, 弃上清, 取沉淀溶于 1mL 试剂一。
3. 血清: 直接测定。

测定步骤:

1. 分光光度计预热 30 min, 调节波长到 500nm, 蒸馏水调零。
2. 在 AK485-C 中加入 10mL AK485-B (振荡混匀 1min), 在 30℃水浴中预热 10 min 以上。用不完的试剂 4℃保存。
3. 样本测定 (在微量石英比色皿/96 孔板中加入)

| 试剂名称 | 空白管 (ul) | 标准管 (ul) | 测定管 (ul) |
|---------|----------|----------|----------|
| AK485-A | 20 | | |
| AK485-B | 30 | 30 | 30 |
| 标准品 | | 20 | |

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 样品 | | | 20 |
| AK485-C | 10 | 10 | 10 |
| 充分混匀, 30℃反应 30min, 沸水浴 1min, 打开盖子, 自然冷却 2min。 | | | |
| AK485-D | 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。 | | | |

PLD 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。

$$\text{PLD 活性 (nmol/min /mg prot)} = (A \text{ 测定管} \div A \text{ 标准管}) \times C \text{ 标准} \div \text{Cpr} \div T = 16.7 \times (A \text{ 测定管} \div A \text{ 标准管}) \div \text{Cpr}$$

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。

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

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。

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

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。

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

注: 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。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司: BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#))

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。

$$\text{PLD 活性 (nmol/min /mg prot)} = (A \text{ 测定管} \div A \text{ 标准管}) \times C \text{ 标准} \div \text{Cpr} \div T = 16.7 \times (A \text{ 测定管} \div A \text{ 标准管}) \div \text{Cpr}$$

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。

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

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。

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

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。

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

注: 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。