



磷脂酶 D 活性检测试剂盒 PLD Assay Kit

分光光度法

产品编号: AK485V

产品规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES485	50mL×1 瓶	4℃保存;
AK485-A	55mL×瓶	4℃避光保存;
AK485-B	8mL×1 瓶	4℃避光保存;
AK485-C	粉剂×1 支	-20℃避光保存。临用前加3mL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	35mL×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、1 mL 玻璃比色皿、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	100		
AK485-B	150	150	150
标准品		100	

样品			100
AK485-C	50	50	50
充分混匀，30℃反应 30min，沸水浴 1min，打开盖子，自然冷却 2min。			
AK485-D	700	700	700
30℃反应30min，于1mL玻璃比色皿，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：

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。

PLD 活性 (nmol/min /mg prot) = (A 测定管÷A 标准管)×C 标准÷Cpr÷T = 16.7×(A 测定管÷A 标准管)÷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。

PLD 活性 (nmol/min /g 鲜重) = (A 测定管÷A 标准管)×C 标准÷W÷T = 16.7×(A 测定管÷A 标准管)÷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。

PLD 活性 (nmol/min /10⁴ cell) = (A 测定管÷A 标准管)×C 标准÷细胞数量÷T = 16.7×(A 测定管÷A 标准管)÷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。

PLD 活性 (nmol/min /mL) = (A 测定管÷A 标准管)×C 标准÷T=16.7×(A 测定管÷A 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](#))

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。