

## 磷脂酶 D ( Phospholipases D, PLD ) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

### 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。

### 组成：

产品名称	FA025-50T/48S	Storage
提取液：液体	50ml	4°C
试剂一：液体	55ml	4°C避光
试剂二：液体	8ml	4°C避光
试剂三：粉剂	1 瓶	-20°C避光
试剂四：液体	35ml	4°C避光
标准品：液体	1ml	4°C避光
说明书	一份	

试剂三：粉剂×1 瓶，-20°C避光保存。临用前加 3ml 无水乙醇充分溶解；用不完的试剂分装后-20°C保存，禁止反复冻融。

### 自备仪器和用品：

天平、研钵、超速冷冻离心机、可见分光光度计、1 ml 玻璃比色皿、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 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、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 (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

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



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	标准管	测定管
试剂一 (μl)	100		
试剂二 (μl)	150	150	150
标准品 (μl)		100	
样品 (μl)			100
试剂三 (μl)	50	50	50
充分混匀, 30°C反应 30min, 沸水浴 10min, 打开盖子, 自然冷却 5min。			
试剂四 (μl)	700	700	700
30°C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。			

### 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 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟水解磷脂酰胆碱产生 1nmol 胆碱所需的酶量一个酶活力单位。

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

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。

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

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



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 8000g, 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。

