

## 磷脂酶 C ( Phospholipases C, PLC ) 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 C (EC 3.1.4.3) 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。

### 组成：

产品名称	FA027-50T/48S	Storage
提取液：液体	50ml	4°C
试剂一：液体	55ml	4°C
试剂二：液体	25ml	4°C避光
试剂三：液体	20ml	4°C
说明书	一份	

### 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。

### 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)		100
试剂一 (μl)	100	

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



试剂二 (μl)	500	500
充分混匀, 37°C反应 30min		
试剂三 (μl)	400	400
充分混匀, 于 1ml 玻璃比色皿, 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:**

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。

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

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  $10^4$  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。

$$\begin{aligned} \text{PLC 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} &= (\Delta A + 0.0103) \div 0.0191 \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times \text{细胞数量}) \div T \\ &= 17.45 \times (\Delta A + 0.0103) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

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 反总: 反应总体积, 1ml; V 样: 加入样本体积, 0.1ml; 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

