

磷脂酶 C (Phospholipases C, PLC) 试剂盒说明书

微量法 100T/96S

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 (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。

组成:

产品名称	FA028-100T/96S	Storage
提取液: 液体	100ml	4°C
试剂一: 液体	102ml	4°C
试剂二: 液体	10ml	4°C避光
试剂三: 液体	8ml	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/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、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 (10⁴ 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	

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)	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 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, 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

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。



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

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。

$$\text{PLC 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = (\Delta A + 0.0103) \div 0.0095 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \div T \\ = 35.09 \times (\Delta A + 0.0103) \div \text{细胞数量}$$

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。

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

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

