

磷脂酶C（Phospholipases C, PLC）试剂盒说明书

微量法100T/96S

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

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。

自备仪器和样品：

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。

试剂组成和配制

提取液：液体100mL×1瓶，4℃保存。

试剂一：液体102mL×1瓶，4℃保存。

试剂二：液体10mL×1瓶，4℃避光保存。

试剂三：液体8mL×1瓶，4℃保存。

酶液提取

- 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℃，10000g离心5min，取全部上清于4℃、100000g离心30min，弃上清，取沉淀溶于1mL试剂一。
- 细胞：按照细胞数量（ 10^4 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℃，10000g离心5min，取全部上清于4℃、100000g离心30min，弃上清，取沉淀溶于1mL试剂一。
- 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	
试剂二（ μL ）	100	100
充分混匀，37℃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

磷脂酶C (Phospholipases C, PLC) 试剂盒说明书酶活性定义: 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。

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

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。

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

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。

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

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