

## 磷脂酶A2（phospholipase A2, PLA2）试剂盒说明书

### 微量法100T/48S

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A2（EC3.1.1.4）是磷脂sn-2位脂酰基水解酶，广泛存在于动植物组织、细菌、细胞核分泌物中，参与脂肪消化，精子成熟、细胞信号传递、脂质过氧化修复、宿主反应等生理过程，在控制体内磷脂类物质平衡、调节机体新陈代谢、参与疾病的病理进程等方面发挥着及其重要的作用。

#### 测定原理：

磷脂酶A2作用于2-硫代十六酰乙基磷酸胆碱（HEPC）产生游离巯基，与DTNB反应生成黄色物质，在412nm处有特征吸收峰。

#### 自备仪器和样品：

天平、超速冷冻离心机、研钵、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板。

#### 试剂组成和配制

提取液：液体100mL×1瓶，4℃保存。

试剂一：液体100mL×1瓶，4℃保存。

试剂二：液体20mL×1瓶，4℃保存。

试剂三：液体×5瓶，-20℃避光保存。临用前根据用量每瓶加入1.8mL试剂二充分混匀；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

#### 样品处理

- 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

	对照管	测定管
样品（ $\mu$ L）	20	20
试剂二（ $\mu$ L）	180	
试剂三（ $\mu$ L）		180

充分混匀，37℃反应10min，于微量石英比色皿/96孔板，蒸馏水调零，测定412nm处吸光值，记为A对照管和A测定管， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$

## 磷脂酶A2 (phospholipase A2, PLA2) 试剂盒说明书计算公式

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

### 1. 按照蛋白浓度计算

酶活性定义：每克组织每分钟水解HEPC产生1nmol游离巯基所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLA2活性 (nmol/min/g 鲜重)} = \Delta A \div (\times d) \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 73.53 \times \Delta A \div W$$

### 3. 细胞数量计算

酶活性定义：每104个细胞每分钟水解HEPC产生1nmol游离巯基所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLA2活性 (nmol/min/104 cell)} = \Delta A \div (\times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 73.53 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

### 4按照液体体积计算

酶活性定义：每毫升血清每分钟水解HEPC产生1nmol游离巯基所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLA2活性 (nmol/min/mL)} = \Delta A \div (\times d) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T$$
$$= 73.53 \times \Delta A$$

: TNB消光系数, 13600L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V反总: 反应总体积, 1mL; V样: 反应体系中加入样本体积, 0.1mL; W: 样本质量, g; V样总: 加入提取液体积, 1mL;

T: 反应时间, 10min

b. 用96孔板测定的计算公式如下

### 1. 按照蛋白浓度计算

酶活性定义：每毫克蛋白每分钟水解HEPC产生1nmol游离巯基所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLA2活性 (nmol/min/mg prot)} = \Delta A \div (\times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$$
$$= 147.06 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

### 2. 按照样本质量计算

酶活性定义：每克组织每分钟水解HEPC产生1nmol游离巯基所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLA2活性 (nmol/min/g 鲜重)} = \Delta A \div (\times d) \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 147.06 \times \Delta A \div W$$

### 3. 细胞数量计算

酶活性定义：每104个细胞每分钟水解HEPC产生1nmol游离巯基所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLA2活性 (nmol/min/104 cell)} = \Delta A \div (\times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 147.06 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

### 4按照液体体积计算

酶活性定义：每毫升血清每分钟水解HEPC产生1nmol游离巯基所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLA2活性 (nmol/min/mL)} = \Delta A \div (\times d) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T$$
$$= 147.06 \times \Delta A$$

: TNB消光系数, 13600L/mol/cm; d: 比色皿光径, 0.5cm; V反总: 反应总体积, 1mL; V样: 反应体系中加入样本体积, 0.1mL; W: 样本质量, g; V样总: 加入提取液体积, 1mL;

T: 反应时间, 10min

