

磷脂酶 D (Phospholipases D, PLD) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

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 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。

自备实验用品及仪器：

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。

试剂组成和配制：

提取液：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 55mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

试剂二：液体 8mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

试剂三：粉剂×1 瓶，-20℃ 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℃ 保存，禁止反复冻融。

试剂四：液体 35mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

标准品：液体 1mL×1 支，4℃ 避光保存。

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℃，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。
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℃，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。
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。

$$\text{PLD 活性 (nmol/min/mg prot)} = \frac{\text{A测定管}}{\text{A标准管}} \times \text{C标准} \div \text{Cpr} \div \text{T} = 16.7 \times \frac{\text{A测定管}}{\text{A标准管}} \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{PLD 活性 (nmol/min/g 鲜重)} = \frac{\text{A测定管}}{\text{A标准管}} \times \text{C标准} \div \text{W} \div \text{T} = 16.7 \times \frac{\text{A测定管}}{\text{A标准管}} \div \text{W}$$

3. 按照细胞数量计算

酶活性定义: 每 10⁴ 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。

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

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。

$$\text{PLD 活性 (nmol/min/mL)} = \frac{\text{A测定管}}{\text{A标准管}} \times \text{C标准} \div \text{T} = 16.7 \times \frac{\text{A测定管}}{\text{A标准管}}$$

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。