

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。

自备实验用品及仪器

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

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

	对照管	测定管
样品 (μL)	20	20
试剂二 (μL)	180	
试剂三 (μL)		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， $\Delta A = A_{测定管} - A_{对照管}$		

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。

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

$$= 73.53 \times \Delta A \div C_{pr}$$

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。

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

3. 细胞数量计算

酶活性定义：每 10^4 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。

$$\begin{aligned} \text{PLA2 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} &= \Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 73.53 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

4 按照液体体积计算

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

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

ε : TNB 消光系数, 13600L/mol/cm; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 1mL;
 $V_{\text{样}}$: 反应体系中加入样本体积, 0.1mL; W : 样本质量, g; $V_{\text{样总}}$: 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。

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

2. 按照样本质量计算

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

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

3. 细胞数量计算

酶活性定义：每 10^4 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。

$$\begin{aligned} \text{PLA2 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} &= \Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 147.06 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

4 按照液体体积计算

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

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

ε : TNB 消光系数, 13600L/mol/cm; d : 比色皿光径, 0.5cm; $V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 1mL;
 $V_{\text{样}}$: 反应体系中加入样本体积, 0.1mL; W : 样本质量, g; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL;
 T : 反应时间, 10min