

**磷脂酶 D ( Phospholipases D, PLD ) 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 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/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、恒温水浴锅、无水乙醇。

**试剂组成和配制**

提取液: 液体 100mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂一: 液体 102mL×瓶, 4℃ 避光保存。

试剂二: 液体 3mL×1 瓶, 4℃ 避光保存。

试剂三: 粉剂×1 支, -20℃ 避光保存。临用前加 1mL 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 15mL×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℃、10000g 离心 30min, 弃上清, 取沉淀溶于 1mL 试剂一。
2. 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℃、10000g 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)	20		
试剂二 (μL)	30	30	30
标准品 (μL)		20	
样品 (μL)			20
试剂三 (μL)	10	10	10
充分混匀, 30℃ 反应 30min, 沸水浴 1min, 打开盖子, 自然冷却 2min。			
试剂四 (μL)	140	140	140
30℃ 反应 30min, 于微量石英比色皿/96 孔板, 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

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磷脂酰胆碱产生 1nmol 胆碱所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLD 活性 (nmol/min /mg prot)} = \frac{A_{\text{测定管}}}{A_{\text{标准管}}} \times C_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}} \div T = 0.017 \times \frac{A_{\text{测定管}}}{A_{\text{标准管}}} \div C_{\text{pr}}$$

2. 按照样本质量计算

**酶活性定义：** 每克组织每分钟水解磷脂酰胆碱产生 1nmol 胆碱所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLD 活性 (nmol/min /g 鲜重)} = \frac{A_{\text{测定管}}}{A_{\text{标准管}}} \times C_{\text{标准}} \div W \div T = 0.017 \times \frac{A_{\text{测定管}}}{A_{\text{标准管}}} \div W$$

3. 按照细胞数量计算

**酶活性定义：** 每  $10^4$  个细胞每分钟水解磷脂酰胆碱产生 1nmol 胆碱所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLD 活性 (nmol/min /}10^4 \text{ cell)} = \frac{A_{\text{测定管}}}{A_{\text{标准管}}} \times C_{\text{标准}} \div \text{细胞数量} \div T = 0.017 \times \frac{A_{\text{测定管}}}{A_{\text{标准管}}} \div \text{细胞}$$

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 胆碱所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLD 活性 (nmol/min /mL)} = \frac{A_{\text{测定管}}}{A_{\text{标准管}}} \times C_{\text{标准}} \div T = 0.017 \times \frac{A_{\text{测定管}}}{A_{\text{标准管}}}$$

C 标准：标准品浓度，500nmol/L；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g/mL；T：反应时间，30min

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磷脂酰胆碱产生 1nmol 胆碱所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLD 活性 (nmol/min /mg prot)} = \frac{A_{\text{测定管}}}{A_{\text{标准管}}} \times C_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}} \div T = 0.017 \times \frac{A_{\text{测定管}}}{A_{\text{标准管}}} \div C_{\text{pr}}$$

2. 按照样本质量计算

**酶活性定义：** 每克组织每分钟水解磷脂酰胆碱产生 1nmol 胆碱所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLD 活性 (nmol/min /g 鲜重)} = \frac{A_{\text{测定管}}}{A_{\text{标准管}}} \times C_{\text{标准}} \div W \div T = 0.017 \times \frac{A_{\text{测定管}}}{A_{\text{标准管}}} \div W$$

3. 按照细胞数量计算

**酶活性定义：** 每  $10^4$  个细胞每分钟水解磷脂酰胆碱产生 1nmol 胆碱所需的酶量为一个酶活力

单位。

$$\text{PLD 活性 (nmol/min /10}^4 \text{ cell)} = \frac{A_{\text{测定管}}}{A_{\text{标准管}}} \times C_{\text{标准}} \div \text{细胞数量} \div T = 0.017 \times \frac{A_{\text{测定管}}}{A_{\text{标准管}}} \div \text{细胞}$$

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 胆碱所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLD 活性 (nmol/min /mL)} = \frac{A_{\text{测定管}}}{A_{\text{标准管}}} \times C_{\text{标准}} \div T = 0.017 \times \frac{A_{\text{测定管}}}{A_{\text{标准管}}}$$

C 标准：标准品浓度，500nmol/L；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 8000rpm，25℃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。