

磷脂酶 C (PLC) 检测试剂盒 (微量法)

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。

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。

粗酶液提取：

- 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 (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。
- 血清：**直接测定。

测定步骤：

	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

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。

PLC 活性 (nmol/min/mg prot) = $(\Delta A + 0.0103) \div 0.0191 \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times C_{pr}) \div T$

$$= 17.45 \times (\Delta A + 0.0103) \div \text{Cpr}$$

2. 按照样本质量计算

酶活性定义：每克组织每分钟水解 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。

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

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。