

## Phospholipases C Activity kit

### 磷脂酶 C (PLC) 活性测定试剂盒说明书

货号: BN72357 | 方法: 可见分光法 | 规格: 24 样

#### 一、产品简介:

磷脂酶 C (PLC, EC 3.1.4.3) 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。

磷脂酶 C 催化水解 O-(4-硝基苯基)胆碱(NPPC)产生对硝基苯酚(PNP), 该产物在 405nm 处有最大吸收峰。通过检测 PNP 在 405nm 下的增加速率, 即可得到 PLC 酶活性大小。

#### 二、试剂盒的组成和配制:

| 试剂名称 | 规格          | 保存要求    | 备注                                                |
|------|-------------|---------|---------------------------------------------------|
| 提取液  | 液体 30mL×1 瓶 | 4℃ 保存   | 用前摇匀再用。                                           |
| 试剂一  | 粉剂 mg×2 支   | -20℃ 保存 | 用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 每支加 0.3mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂-20℃ 保存。 |
| 试剂二  | 粉剂 mg×1 支   | 4℃ 保存   | 用前甩几下使粉剂落入底部, 加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。                    |
| 试剂三  | 液体 30mL×1 瓶 | 4℃ 保存   |                                                   |
| 试剂四  | 液体 4mL×1 支  | 4℃ 保存   |                                                   |
| 标准品  | 粉剂×1 支      | 4℃ 保存   | 若重新做标曲, 则用到该试剂。                                   |

#### 三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、低温离心机、水浴锅或恒温培养箱、可调式移液器和蒸馏水。

#### 四、磷脂酶 C (PLC) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

##### 1、样本制备:

- ① 组织样本: 取约 0.1g 组织 (水分充足的果实样本可取 0.2-0.3g), 加入 1mL 提取液 (用前摇匀再用), 进行冰浴匀浆, 13000rpm, 4℃ 离心 15min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例提取。

- ② 细菌/细胞样本: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 13000rpm 4℃ 离心 15min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 ( $10^4$ ): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

##### 2、上机检测:

- ① 可见分光光度计预热 30min, 调节波长到 405nm, 蒸馏水调零。
- ② 所有试剂解冻至室温 (25℃), 在 EP 管中依次加入:

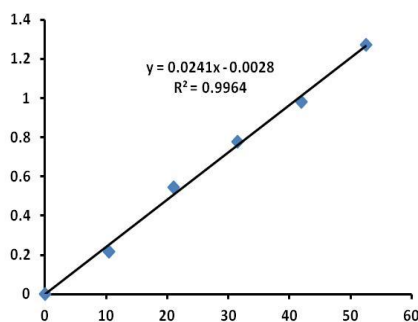
| 试剂名称 (μL) | 测定管 | 对照管 |
|-----------|-----|-----|
| 样本        | 105 | 105 |
| 试剂一       | 20  |     |
| 试剂二       | 20  | 20  |

|                                                                                   |     |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 试剂三                                                                               | 485 | 505 |
| 混匀，37℃孵育反应 30min。                                                                 |     |     |
| 试剂四                                                                               | 70  | 70  |
| 混匀，取全部液体至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 405nm 处读吸光值 A， $\Delta A=A$ 测定-A 对照(每个样本需做一个自身对照)。 |     |     |

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；  
针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

## 五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 0.0241x - 0.0028$ ，x 是 PNP 摩尔质量(nmol)，y 是  $\Delta A$ 。



标准曲线示意图

说明：标准曲线由标准品测定获得，具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

2、按照样本蛋白浓度计算：

酶活定义：37℃中每毫克蛋白每分钟水解 1nmol NPPC 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$PLC (nmol/min/mg \text{ prot}) = [(\Delta A + 0.0028) \div 0.0241] \div (Cpr \times V1) \div T \times D = 13.2 \times (\Delta A + 0.0028) \div Cpr \times D$$

3、按照样本质量计算：

酶活定义：37℃中每克组织每分钟水解 1nmol NPPC 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$PLC (nmol/min/g \text{ 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0028) \div 0.0241] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 13.2 \times (\Delta A + 0.0028) \div W \times D$$

4、按细菌/细胞数量计算：

酶活定义：每  $10^4$  个细胞每分钟水解 1nmol NPPC 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$PLC (nmol/min/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0028) \div 0.0241] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D = 0.03 \times (\Delta A + 0.0028) \times D$$

5、按液体体积计算：

酶活定义：37℃中每毫升液体每分钟水解 1nmol NPPC 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$PLC (nmol/min/mL) = [(\Delta A + 0.0028) \div 0.0241] \div V1 \div T \times D = 13.2 \times (\Delta A + 0.0028) \times D$$

V---提取液体积，1 mL；

V1---加入反应体系中上清液体积 (mL)，0.105mL；

T---反应时间 (min)，30 min；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

W ---样品质量，g；

500---细胞数量；

Cpr---粗酶液蛋白质浓度 (mg/mL)，建议使用本公司的 BCA 蛋白质含量测定试剂盒；