

Phospholipases D Activity kit

磷脂酶 D (PLD) 活性测定试剂盒说明书

货号:BN72359 | 方法: 可见分光法 | 规格: 24 样

一、产品简介:

磷脂酶 D (EC 3.1.4.4) 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。

磷脂酶 D 催化水解底物 O-(4-硝基苯基)胆碱 (NPPC), 并在外加酸性磷酸酶的作用下产生对硝基苯酚(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 PLD 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	-20℃保存	用前甩几下使粉剂落入底部, 加 1.2mL 蒸馏水溶解且 5000rpm 离心 5min, 取上清液备用。用不完的上清液-20℃保存。
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 D (PLD) 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。

- ③ 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

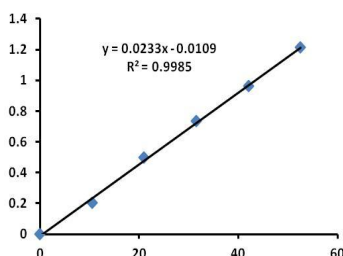
- ① 可见分光光度计预热 30min, 调节波长到 405nm, 蒸馏水调零。
- ② 所有试剂解冻至室温 (25℃), 在 EP 管中依次加入:

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°C 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, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (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: $y = 0.0233x - 0.0109$, x 是 PNP 摩尔质量(nmol), y 是 ΔA 。



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°C 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。

$$\text{PLD (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0109) \div 0.0233] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T \times D = 13.6 \times (\Delta A + 0.0109) \div \text{Cpr} \times D$$

3、按照样本质量计算:

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

$$\text{PLD (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0109) \div 0.0233] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 13.6 \times (\Delta A + 0.0109) \div W \times D$$

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。

$$\text{PLD (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0109) \div 0.0233] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D = 0.03 \times (\Delta A + 0.0109) \times D$$

5、按液体体积计算:

酶活定义: 37°C 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。

$$\text{PLD (nmol/min/mL)} = [(\Delta A + 0.0109) \div 0.0233] \div V1 \div T \times D = 13.6 \times (\Delta A + 0.0109) \times D$$

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;