

磷脂酶 C (Phospholipases C, PLC) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

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 (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。

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。

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、1 mL 玻璃比色皿、恒温水浴锅。

试剂组成和配制：

提取液：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 55mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 25mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

试剂三：液体 20mL×1 瓶，4℃ 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℃、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

	空白管	测定管
样品 (μL)		100
试剂一 (μL)	100	
试剂二 (μL)	500	500
充分混匀，37℃ 反应 30min		
试剂三 (μL)	400	400
充分混匀，于 1mL 玻璃比色皿，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， $\Delta A = A$ 测定管 - A 空白管。		

酶活计算公式:

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。

$$\begin{aligned} \text{PLC 活性 (nmol/min/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0103) \div 0.0191 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 17.45 \times (\Delta A + 0.0103) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{PLC 活性 (nmol/min/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.0103) \div 0.0191 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 17.45 \times (\Delta A + 0.0103) \div W \end{aligned}$$

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, 1mL; V 样: 加入样本体积, 0.1mL; 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