

磷脂酶 C (PLC) 活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC2425

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 110 mL×1 瓶	2-8°C保存
提取液二	液体 0.6mL×2 支	-20°C保存
试剂一	液体 110 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 15mL×1 瓶	-20°C保存
试剂三	液体 10mL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8°C保存

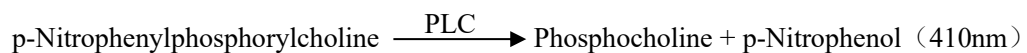
溶液配制：

1. 提取液二：试剂易挥发，用完后快速拧盖，封口封缠口。
2. 标准品：5 μ mol/mL 对硝基苯酚溶液。
3. 提取液的配制：临用前根据样本量将提取液一与提取液二 1:1 混合，切勿一次性全部混合，用多少配多少。

产品说明：

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。

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。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、超速冷冻离心机、可调式移液枪、天平、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、蒸馏水、冰。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

- 1、组织：按照质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例加入提取液，建议称取约 0.1g 样本，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆后于 4°C，10 000g 离心 5min；取全部上清再于 4°C、100 000g 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°C，10 000g 离心

5min; 取全部上清再于 4°C、100 000g 离心 30min, 弃上清, 取沉淀溶于 1mL 试剂一。

3、血清(浆): 直接测定。

二、测定步骤

1、可见分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长到 410nm, 分光光度计蒸馏水调零。

2、标准溶液的稀释: 将 5 μ mol/mL 对硝基苯酚溶液用蒸馏水稀释至 1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078、0.039、0.02、0.01 μ mol/mL。

3、标准品稀释表:

序号	稀释前浓度 (μ mol/mL)	标准液体积 (μ L)	蒸馏水体积 (μ L)	稀释后浓度 (μ mol/mL)
1	5	125	375	1.25
2	1.25	200	200	0.625
3	0.625	200	200	0.3125
4	0.3125	200	200	0.15625
5	0.15625	200	200	0.078
6	0.078	200	200	0.039
7	0.039	200	200	0.02
8	0.02	200	200	0.01

备注: 实验中每个标准管需 20 μ L 标准溶液。

4、样本测定: (在 EP 管或者 96 孔板中加入下列试剂)

试剂名称 (μ L)	空白管	测定管	标准管
标准品	-	-	20
样本	-	20	-
试剂一	20	-	-
试剂二	100	100	100
充分混匀, 37°C反应 30min			-
试剂三	80	80	80

充分混匀后测定 410nm 处吸光值, 分别记为 A 空白、A 测定和 A 标准, $\Delta A = A$ 测定管 - A 空白管, ΔA 标 = A 标准 - A 空白。标准曲线和空白管只需做 1-2 次。

三、酶活计算

1、标准曲线:

以标准品浓度 (x, μ mol/mL) 为横坐标, 吸光度 ΔA 标 (y) 为纵坐标建立标准曲线。根据标准曲线, 将 ΔA 带入公式中计算浓度 x (μ mol/mL)。

2、酶活测定:

(1) 按蛋白浓度计算

酶活定义: 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。

$$PLC \text{ 活性 (U/mg prot)} = x \times V \text{ 样} \div (V \text{ 样} \times C_{pr}) \div T = 0.033 \times x \div C_{pr}$$

(2) 按样本质量计算

酶活定义: 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。

$$PLC \text{ 活性 (U/g 质量)} = x \times V \text{ 样总} \div W \div T = 0.033 \times x \div W$$

(3) 按细菌或细胞数量计算

酶活定义：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。

$$\text{PLC 活性(U/10}^4\text{ cell)} = x \times V \text{ 样总} \div \text{细胞数量} \div T = 0.033 \times x \div \text{细胞数量}$$

(4) 按血清（浆）体积计算：

酶活定义：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。

$$\text{PLC 活性 (U/mL)} = x \div T = 0.033 \times x$$

V 样：加入样本体积，0.02mL；V 样总：加入的试剂一体积，1mL；W：样本质量，g；细胞数量：以万计；
Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；T：反应时间，30min。

相关系列产品：

BC2410/BC2415 磷脂酶 D (PLD) 活性检测试剂盒

BC2430/BC2435 磷脂酶 A2 (PLA2) 活性检测试剂盒