



磷脂酶 D 活性检测试剂盒

PLD Assay Kit

微量法

产品编号: AK485M

产品规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES485	100mL×1 瓶	4℃保存;
AK485-A	102mL×瓶	4℃避光保存;
AK485-B	3mL×1 瓶	4℃避光保存;
AK485-C	粉剂×1 支	-20℃避光保存。临用前加1mL无水乙醇充分溶解; 剩余试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融。
AK485-D	15mL×1 瓶	4℃避光保存;
AK485-S	1mL×1 支	(标准品) 4℃避光保存;

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 磷脂酶 D (Phospholipases D, PLD; EC3.1.4.4) 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。

原理: 磷脂酶 D 催化水解磷脂酰胆碱末端的磷脂酰二酯键生成磷脂酸和胆碱, 胆碱在胆碱氧化酶催化作用下生成甜菜碱和过氧化氢, 过氧化氢在过氧化氢酶的作用下将 4-氨基安替比林和重蒸酚氧化成粉红色物质, 在 500nm 处有特征吸收峰。

自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、天平、研钵、超速冷冻离心机、恒温水浴锅、无水乙醇。

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 ES485) 加入 ES485, 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 AK485-A。
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 ES485), 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 AK485-A。
3. 血清: 直接测定。

测定步骤:

1. 分光光度计/酶标仪预热 30 min, 调节波长到 500nm, 蒸馏水调零。
2. 样本测定 (在 EP 管中加入)

试剂名称	空白管 (ul)	标准管 (ul)	测定管 (ul)
AK485-A	20		
AK485-B	30	30	30
标准品		20	
样品			20
AK485-C	10	10	10
充分混匀, 30℃反应 30min, 沸水浴 1min, 打开盖子, 自然冷却 2min。			

AK485-D	140	140	140
30℃反应30min，于微量石英比色皿/96孔板，空白管调零，测定500nm处吸光值，分别记为A标准管和A测定管。			

PLD 酶活计算公式：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 按照蛋白浓度计算：

酶活性定义：每毫克蛋白每分钟水解磷脂酰胆碱产生 1nmol 胆碱所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLD 活性 (U/mg prot)} = (\text{A 测定管} \div \text{A 标准管}) \times \text{C 标准} \div \text{Cpr} \div \text{T} = 16.7 \times (\text{A 测定管} \div \text{A 标准管}) \div \text{Cpr}$$

2. 按照样本质量计算：

酶活性定义：每克组织每分钟水解磷脂酰胆碱产生 1nmol 胆碱所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLD 活性 (U/g 鲜重)} = (\text{A 测定管} \div \text{A 标准管}) \times \text{C 标准} \div \text{W} \div \text{T} = 16.7 \times (\text{A 测定管} \div \text{A 标准管}) \div \text{W}$$

3. 按照细胞数量计算

酶活性定义：每 10⁴ 个细胞每分钟水解磷脂酰胆碱产生 1nmol 胆碱所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLD 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = (\text{A 测定管} \div \text{A 标准管}) \times \text{C 标准} \div \text{细胞数量} \div \text{T} = 16.7 \times (\text{A 测定管} \div \text{A 标准管}) \div \text{细胞数量}$$

4. 按照液体体积计算

酶活性定义：每毫升血清每分钟水解磷脂酰胆碱产生 1nmol 胆碱所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLD 活性 (U/mL)} = (\text{A 测定管} \div \text{A 标准管}) \times \text{C 标准} \div \text{T} = 16.7 \times (\text{A 测定管} \div \text{A 标准管})$$

注：C 标准：标准品浓度，500nmol/mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g/mL；T：反应时间，30min。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#))

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

1. 按照蛋白浓度计算

酶活性定义：每毫克蛋白每分钟水解磷脂酰胆碱产生 1nmol 胆碱所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLD 活性 (U/mg prot)} = (\text{A 测定管} \div \text{A 标准管}) \times \text{C 标准} \div \text{Cpr} \div \text{T} = 16.7 \times (\text{A 测定管} \div \text{A 标准管}) \div \text{Cpr}$$

2. 按照样本质量计算

酶活性定义：每克组织每分钟水解磷脂酰胆碱产生 1nmol 胆碱所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLD 活性 (U/g 鲜重)} = (\text{A 测定管} \div \text{A 标准管}) \times \text{C 标准} \div \text{W} \div \text{T} = 16.7 \times (\text{A 测定管} \div \text{A 标准管}) \div \text{W}$$

3. 按照细胞数量计算

酶活性定义：每 10⁴ 个细胞每分钟水解磷脂酰胆碱产生 1nmol 胆碱所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLD 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = (\text{A 测定管} \div \text{A 标准管}) \times \text{C 标准} \div \text{细胞数量} \div \text{T} = 16.7 \times (\text{A 测定管} \div \text{A 标准管}) \div \text{细胞数量}$$

4. 按照液体体积计算

酶活性定义：每毫升血清每分钟水解磷脂酰胆碱产生 1nmol 胆碱所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLD 活性 (U/mL)} = (\text{A 测定管} \div \text{A 标准管}) \times \text{C 标准} \div \text{T} = 16.7 \times (\text{A 测定管} \div \text{A 标准管})$$

注：C 标准：标准品浓度，500nmol/mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g/mL；T：反应时间，30min。

注意事项

1. 显色完成后，若有沉淀，于 8000rpm，25℃离心 5min 后取上清测定。
2. 吸光值不宜超过 1，否则用试剂 A 将酶液进行稀释，并在计算公式中乘以稀释倍数。