



磷脂酶 C 活性检测试剂盒 PLC Assay Kit

微量法

产品编号: AK486M

产品规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES486	100mL×1 瓶	4℃保存
AK486-A	102mL×1 瓶	4℃保存
AK486-B	15mL×1 瓶	4℃避光保存
AK486-C	10mL×1 瓶	4℃保存
AK486-标准品 (5umol/ml)	1mL×1 瓶	4℃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 C (Phospholipases 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。

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。

自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、天平、研钵、超速冷冻离心机、恒温水浴锅、冰和蒸馏水。

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 ES486) 加入 ES486, 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 AK486-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 ES486), 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 AK486-A。
3. 血清: 直接测定。

测定步骤:

1. 分光光度计或酶标仪预热 30 min, 调节波长到 410nm, 蒸馏水调零。
2. 标准溶液的稀释: 将 5umolmL 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 umolmL。
3. 样本测定 (在微量石英比色皿/96 孔板中加入)

试剂名称	空白管 (ul)	测定管 (ul)	标准管 (ul)
样品		20	
标准品			20
AK486-A	20		
AK486-B	100	100	100
充分混匀, 37℃反应 30min			
AK486-C	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。

注: 标准曲线和空白管只需做 1-2 次。

PLC 酶活计算公式:

1. 建立标准曲线:

以标准品浓度 (x , $\mu\text{mol/mL}$) 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 ($\mu\text{mol/mL}$)。

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。

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

(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。

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

(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。

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

(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。

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

注: $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.02mL; $V_{\text{样总}}$: 加入的试剂 A 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。

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