

磷脂酶 A2(PLA2) 活性检测试剂盒 (微量法)
(本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

| 产品编号 | 产品名称 | 产品规格 |
|---------|-------------------------------|------------|
| YFX0420 | 磷脂酶 A2(PLA2) 活性检测试剂盒 (分光光度计法) | 100 管/48 样 |

产品内容

| 名称 | 规格 | 储存条件 |
|-----|--|----------|
| 提取液 | 液体 100mL × 1 瓶 | 4℃ |
| 试剂一 | 液体 100mL × 1 瓶 | 4℃ |
| 试剂二 | 液体 20mL × 1 瓶 | 4℃, 避光 |
| 试剂三 | 液体 × 5 瓶: 临用前根据用量, 每瓶加入 1.8mL 试剂二, 充分混匀。用不完的试剂分装后-20℃, 避光储存, 严禁反复冻融。 | -20℃, 避光 |

一、产品说明

磷脂酶 A2 (EC3.1.1.4) 是磷脂 sn-2 位脂酰基水解酶, 广泛存在于动植物组织、细菌、细胞核分泌物中, 参与脂肪消化, 精子成熟、细胞信号传递、脂质过氧化修复、宿主反应等生理过程, 在控制体内磷脂类物质平衡、调节机体新陈代谢、参与疾病的病理进程等方面发挥着及其重要的作用。

磷脂酶 A2 作用于 2-硫代十六酰乙基磷酸胆碱 (HEPC) 产生游离巯基, 与 DTNB 反应生成黄色物质, 在 412nm 处有特征吸收峰。

二、自备材料

天平, 超速冷冻离心机, 紫外分光光度计/酶标仪、研钵、微量石英比色皿/96 孔板。

三、样品准备

1、组织: 按照组织质量 (g) : 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液), 进行冰浴匀浆, 10000g 4℃ 离心 5min, 取全部上清, 10000g 4℃ 离心 30min, 弃上清, 沉淀溶于 1mL 试剂一。

2、细胞/细菌: 按照细菌或细胞数量 (10^4 个) : 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液), 冰浴超声波破碎细菌或细胞 (功率 300W, 超声 3s, 间隔 7s, 总时间 3min); 10000g 4℃ 离心 5min, 取全部上清, 10000g 4℃ 离心 30min, 弃上清, 沉淀溶于 1mL 试剂一。

3、血清/血浆样品: 直接检测。

四、操作步骤

正式测定前, 必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 412nm, 蒸馏水调零。

2、操作表:

| 名称 (μL) | 对照管 | 测定管 |
|---------|-----|-----|
| 样本 | 20 | 20 |

| | | |
|---|-----|-----|
| 试剂二 | 180 | |
| 试剂三 | | 180 |
| 充分混匀, 37°C 反应 10min, 于微量石英比色皿/96 孔板, 测定 412nm 处吸光值, 记为 A 对照管和 A 测定管, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。 | | |

五、PLA2 活性的计算

A. 使用 96 孔板测定的计算公式如下:

1、按照样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每mg蛋白每分钟水解HEPC产生1nmol游离巯基所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLA2 活性 (nmol/min/mg prot)} = \Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T$$

$$= 147.06 \times \Delta A \div \text{Cpr}。$$

2、按照样本鲜重计算:

酶活定义: 每 g 组织每分钟水解 HEPC 产生 1nmol 游离巯基所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLA2 活性 (nmol/min/g 鲜重)} = \Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 147.06 \times \Delta A \div W。$$

3、按照细菌/细胞密度计算:

酶活定义: 每 10^4 个细胞每分钟水解 HEPC 产生 1nmol 游离巯基所需的酶量为一个酶活单位。

$$\text{PLA2 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ ceLL)} = \Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 147.06 \times \Delta A \div \text{细胞数量}。$$

4、按照液体体积计算

酶活定义: 每毫升血清每分钟水解HEPC产生 1nmol 游离巯基所需的酶量为一个酶活单位。

$$\text{PLA2 活性 (nmol/min/mL)} = \Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 147.06 \times \Delta A。$$

ε : TNB 消光系数, 13600L/mol/cm; d: 比色皿光径, 0.5cm; $V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 1mL;

$V_{\text{样}}$: 反应体系中加入样本体积, 0.1mL; W: 样本质量, g; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 10min。

B. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下:

1、按照样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每mg蛋白每分钟水解HEPC产生1nmol游离巯基所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLA2 活性 (nmol/min/mg prot)} = \Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T$$

$$= 73.53 \times \Delta A \div \text{Cpr}。$$

5、按照样本鲜重计算:

酶活定义: 每 g 组织每分钟水解 HEPC 产生 1nmol 游离巯基所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{PLA2 活性 (nmol/min/g 鲜重)} = \Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 73.53 \times \Delta A \div W。$$

6、按照细菌/细胞密度计算:

酶活定义: 每 10^4 个细胞每 min 水解 HEPC 产生 1nmol 游离巯基所需的酶量为一个酶活单位。

PLA2 活性 (nmol/min/10⁴ ceLL) = $\Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T$
= 73.53 × $\Delta A \div \text{细胞数量}$ 。

7、按照液体体积计算

酶活定义: 每毫升血清每分钟水解HEPC产生 1nmol 游离巯基所需的酶量为一个酶活单位。

PLA2 活性 (nmol/min/mL) = $\Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 73.53 \times \Delta A$ 。

ε : TNB 消光系数, 13600L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 1mL;

$V_{\text{样}}$: 反应体系中加入样本体积, 0.1mL; W: 样本质量, g; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 10min。