（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

产品货号：E-BC-K781-M

产品规格：48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器：酶标仪(405-415 nm)

Elabscience®磷脂酶 C（PLC）比色法测试盒

Phospholipase C (PLC) Activity Colorimetric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100
邮箱：biochemical@elabscience.cn
网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清(浆)、动植物组织及细胞样本中的磷脂酶 C(PLC)的活力。

检测原理

磷脂酶 C（Phospholipase C，PLC）是一类广泛存在于动植物和微生物中的酶家族，其核心功能是水解细胞膜磷脂中的磷酸二酯键，生成重要的第二信使分子。PLC 在神经信号传导和保护中也发挥关键作用，有助于理解和治疗神经退行性疾病。此外，PLC 在胰岛素信号传导和脂质代谢中起重要作用，使其成为糖尿病和肥胖研究的热点。近年来，磷脂酰胆碱特异性磷脂酶 C(PC-PLC)在细胞信号转导中的作用日益被重视，已证实该酶参与了数种细胞凋亡信号的转导。

PLC 催化底物反应生成显色物质在波长 410 nm 处有最大吸收，通过测定 410 nm 处的 OD 值大小计算 PLC 酶活。

本试剂盒检测组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，动物组织和细胞样本推荐使用 BCA 法。(货号：E-BC-K318-M)。植物组织样本推荐使用考马斯亮蓝法。(货号：E-BC-K168-M)。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	10 mL×1 瓶	20 mL×1 瓶	-20ºC 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	0.75 mL×1 支	1.5 mL×1 支	-20ºC 避光保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	5 mmol/L标准品溶液 (5 mmol/L Standard Solution)	1 mL×1 支	1 mL×1 支	-20ºC 避光保存 6 个月
	96 孔酶标板	48 孔×1 块	96 孔×1 块	无要求
	96 孔覆膜	2 张		

	样本位置标记表	1 张	

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(405-415 nm，最佳检测波长 410 nm)、37°C 恒温箱

试剂：生理盐水 (0.9% NaCl)

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温(25°C)。

② 0.5 mmol/L标准品配制：

将双蒸水：试剂三按体积比=9：1配制，避光待用，现配现用，当天使用有效。

③ 工作液的配制：

将试剂一：试剂二按体积比=9：1配制，避光待用，现配现用，当天使用有效。

④ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(mmol/L)	**0**	**0.10**	**0.15**	**0.20**	**0.30**	**0.35**	**0.40**	**0.50**
0.5 mmol/L 标准品(μL)	0	40	60	80	120	140	160	200
双蒸水(μL)	200	160	140	120	80	60	40	0

样本准备

① 样本处理

血清(浆)样本：直接测定。

组织样本：按照组织样本质量(g)：生理盐水（0.9% NaCl）体积(mL)=1:9的比例匀浆(如 0.1 g 组织样本，加入 0.9 mL 生理盐水)。4°C，10000 × g 离心 10 min，取上清待测，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

细胞样本：按照每 2×10^6 个细胞，加入 200 μL 生理盐水（0.9% NaCl）进行匀浆。4°C，10000 × g 离心 10 min，取上清待测，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.383-16.588 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%小鼠肝组织	不稀释	2×10^6 个 HL-60 细胞	不稀释
10%小鼠肾组织	2-5	1.8×10^6 个 Hela 细胞	不稀释
10%小鼠心组织	不稀释	2×10^6 个 CHO 细胞	不稀释
10%小鼠肺组织	不稀释	10%绿豆芽组织	2-5
大鼠血清	2-5	10%毛豆组织	2-5
小鼠血清	2-5	10%花生组织	2-5
人血清	2-5	10%西蓝花组织	2-5

注：稀释液为生理盐水(0.9% NaCl)。

操作步骤

① 标准孔：取 20 μL 不同浓度的标准品溶液，分别加入相应的酶标孔中。测定孔：取 20 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。

② 向步骤①中各孔加入 120 μL 工作液。

③ 振板 5 s，酶标仪 410 nm 波长下检测测定孔 OD 值 A_1。37°C 孵育 30 min 后检测测定孔的 OD 值 A_2 和标准孔的 OD 值。

操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度的标准品溶液(μL)	20	--
待测样本(μL)	--	20
工作液(μL)	120	120
振板 5 s，酶标仪 410 nm 波长下检测测定孔 OD 值 A_1。37°C 孵育 30 min 后检测测定孔的 OD 值 A_2 和标准孔的 OD 值。		

本试剂盒检测组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，动物组织和细胞样本推荐使用 BCA 法。(货号：E-BC-K318-M)。植物组织样本推荐使用考马斯亮蓝法。(货号：E-BC-K168-M)。

结果计算

标准品拟合曲线：y = ax + b

① 血清(浆)样本中磷脂酶 C (PLC)活力计算公式：

定义：37°C 条件下，每升血清(浆)每分钟催化底物产生 1 μmol 的产物所需要的酶活为一个活力单位。

$$\text{PLC 活力 (U/L)} = (\Delta A_{410} - b) \div a \div T \times f \times 1000$$

② 组织或细胞样本中磷脂酶 C(PLC)活力计算公式：

定义：37°C 条件下，每克组织或细胞蛋白每分钟催化底物产生 1 μmol 的产物所需要的酶活为一个活力单位。

$$\text{PLC 活力 (U/gprot)} = (\Delta A_{410} - b) \div a \div T \times f \div C_{pr} \times 1000$$

注解：

y：标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x：标准品的浓度

a：标曲的斜率

b：标曲的截距

ΔA_{410}：测定孔变化 OD 值，$\Delta A_{410} = A_2 - A_1$

T：反应时间，30 min

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

Cpr：待测样本的蛋白浓度，gprot/L

1000：单位换算，1 mmol/L = 1000 μmol/L

附录1 关键数据

1. 技术参数

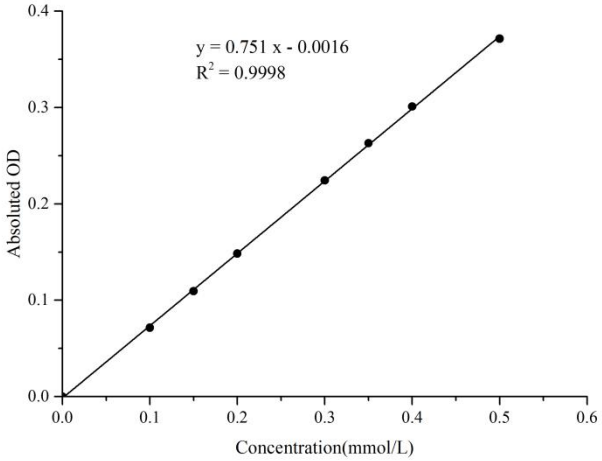
检测范围	0.383-16.588 U/L	批间差	6.7-9.9%
灵敏度	0.383 U/L	批内差	1.8-3.0%
稀释回收率	100-101%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量20 μL，按照操作步骤进行实验，OD值如下表所示：

标准品浓度 (mmol/L)	0	0.10	0.15	0.20	0.30	0.35	0.40	0.50
OD 值	0.101	0.175	0.216	0.255	0.330	0.372	0.406	0.479
	0.109	0.178	0.213	0.252	0.329	0.364	0.406	0.474
平均 OD 值	0.105	0.177	0.215	0.254	0.330	0.368	0.406	0.477
绝对 OD 值	0	0.072	0.110	0.149	0.225	0.263	0.301	0.372

② 绘制标曲(如下图)：



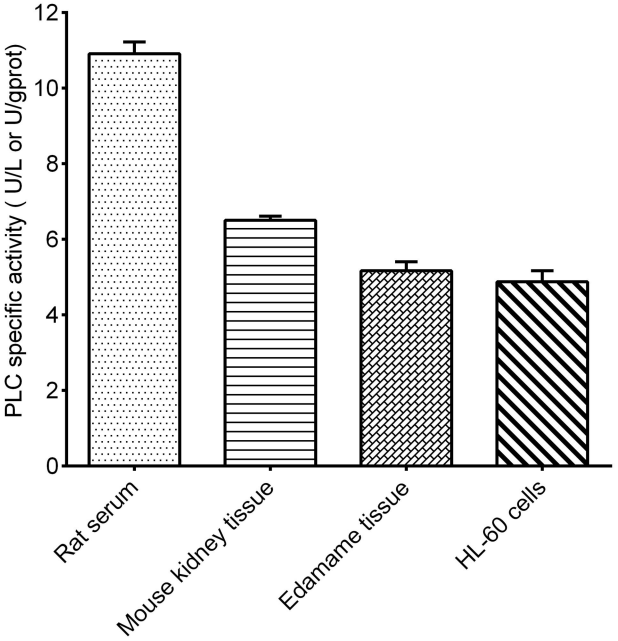
附录2 实例分析

例如大鼠血清(数据仅供参考)：

取20 μL稀释2倍的大鼠血清加入到酶标板孔中，按操作表操作，结果如下：标准曲线：y = 0.751 x - 0.0016，测定孔A_1值为0.417，A_2值为0.585，$\Delta A_{410} = A_2 - A_1 = 0.585 - 0.471 = 0.114$，计算结果为：

$$\text{PLC活力(U/L)} = (0.114 + 0.0016) \div 0.751 \div 30 \times 2 \times 1000 = 10.26\ \text{U/L}$$

按说明书操作，测定大鼠血清(稀释倍数为2，加样量20 μL)、小鼠肾组织(10%组织匀浆蛋白浓度为9.635 gprot/L，稀释倍数为2，加样量20 μL)、毛豆组织(10%组织匀浆蛋白浓度为3.201 gprot/L，稀释倍数为2，加样量20 μL)、HL-60细胞(1.8×10^6个，蛋白浓度为1.444 gprot/L，加样量20 μL)中的PLC活力(如下图)：



声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。