

(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) 是能分解磷脂酰肌醇二磷酸 (PIP<sub>2</sub>) 生成二酰甘油 (DAG) 和肌醇三磷酸 (IP<sub>3</sub>) 的一种水解酶。PLC 广泛存在于细菌、植物和动物体内。其异常表达与多种癌症相关, 研究 PLC 机制有助于开发新的抗癌疗法。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。

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	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	0.75 mL×1 支	1.5 mL×1 支	-20°C 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	-20°C 避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板	1 板		
	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 ℃ 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 ℃)。

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℃，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  $2 \times 10^6$  个细胞，加入 200  $\mu$ L 生理盐水（0.9% NaCl）进行匀浆。4℃，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	$2 \times 10^6$ 个 HL-60 细胞	不稀释
10%小鼠肾组织	2-5	$1.8 \times 10^6$ 个 HeLa 细胞	不稀释
10%小鼠心组织	不稀释	$2 \times 10^6$ 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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  待测样本加入相应的酶标孔中。
- ② 向步骤①中各孔加入 120  $\mu\text{L}$  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  $^{\circ}\text{C}$  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( $\mu\text{L}$ )	20	--
待测样本( $\mu\text{L}$ )	--	20
工作液( $\mu\text{L}$ )	120	120
振板 5 s, 酶标仪 410 nm 波长下检测测定孔 OD 值 $A_1$ 。37 $^{\circ}\text{C}$ 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℃ 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℃ 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

$\Delta A_{410}$ : 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

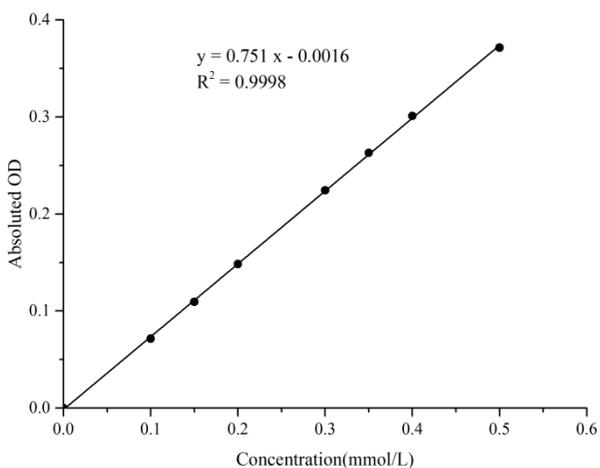
检测范围	0.383-16.588 U/L	批间差	6.7-9.9%
灵敏度	0.383 U/L	批内差	1.8-3.0%
稀释回收率	100-101%		

### 2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量20  $\mu$ L, 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):



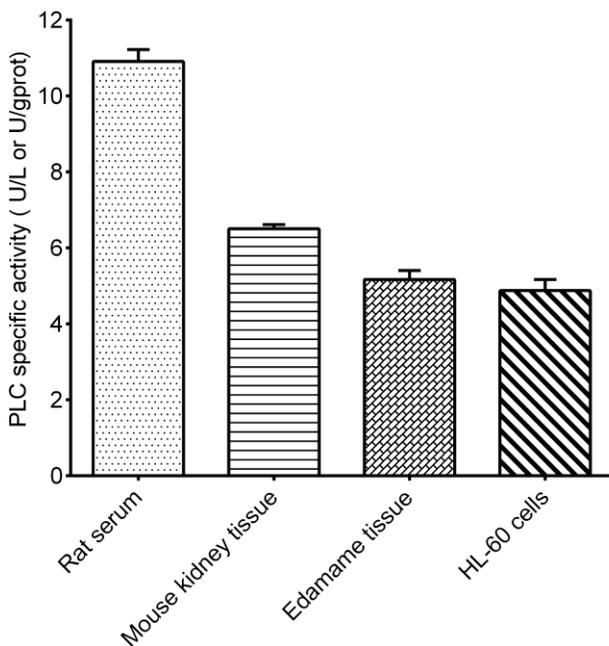
## 附录2 实例分析

例如大鼠血清(数据仅供参考):

取20  $\mu\text{L}$  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:  $y = 0.751x - 0.0016$ , 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  $\mu\text{L}$ )、小鼠肾组织(10%组织匀浆蛋白浓度为9.635  $\text{gprot/L}$ , 稀释倍数为2, 加样量20  $\mu\text{L}$ )、毛豆组织(10%组织匀浆蛋白浓度为3.201  $\text{gprot/L}$ , 稀释倍数为2, 加样量20  $\mu\text{L}$ )、HL-60细胞( $1.8 \times 10^6$ 个, 蛋白浓度为1.444  $\text{gprot/L}$ , 加样量20  $\mu\text{L}$ )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。





