

(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-K783-M**

**产品规格: 48T(32 samples)/96T(80 samples)**

**检测仪器: 酶标仪(540-560 nm)**

## **Elabscience®磷脂酶 D(PLD)比色法测试盒**

### **Phospholipase D (PLD) 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)、动植物组织样本中的磷脂酶 D 的活力。

## 检测原理

磷脂酶 D (Phospholipase D, PLD)广泛存在于自然界的植物和动物中, PLD 在磷脂代谢中起关键作用。PLD 水解甘油磷脂的磷酸二酯键, 产生磷脂酸和含氮碱基。PLD 的活性和表达异常与阿尔茨海默病、中风、癌症和其他脑部疾病相关。

本试剂盒的检测原理是底物通过 PLD 催化下与显色剂生成有颜色的物质, 其在波长 550 nm 处有最大吸收, 通过测定 550 nm 处的 OD 值大小, 根据标准曲线计算样本中 PLD 活力。

本试剂盒检测组织样本时, 需测定总蛋白浓度, 动物组织蛋白推荐使用 BCA 法 (货号: E-BC-K318-M), 植物组织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)	50 mL×1 瓶	50 mL×2 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	1.5 mL×1 支	1.5 mL×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	催化剂 (Catalyst)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	显色剂 (Chromogenic Agent)	2.5 mL×1 瓶	5 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	10 mmol/L 标准品溶液 (10 mmol/L Standard Solution)	0.75 mL×1 支	1.5 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(540-560 nm，最佳检测波长 550 nm)、37 °C 恒温箱

## 试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至25 °C。

② 试剂三工作液的配制：

取一支试剂三加入450 μL双蒸水，溶解混匀，未使用完的试剂可在-20 °C避光保存7天。

③ 测定工作液的配制：

将试剂一：试剂二：试剂三工作液按体积比=25：4：1配制，现配现用，置于冰上避光待用，当天使用有效。

④ 0.5 mmol/L标准品的配制：

将试剂一：试剂五按体积比=19：1配制，现配现用，置于冰上避光待用，当天使用有效。

⑤ 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
试剂一(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)：试剂一体积(mL)=1：9的比例匀浆，4°C，10000 × g离心10 min，取上清置于冰上待测。留取部分上清用于蛋白浓度测定。

### 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：0.68-16.73 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	2-4	小鼠血清	不稀释
10%小鼠肾组织	2-4	小鼠血浆	不稀释
10%小鼠心组织	2-4	人血清	不稀释
10%大鼠肝组织	2-4	兔血浆	不稀释
10%花生组织	1-3	10%玉米种子组织	1-3
10%毛豆组织	1-3		

注：稀释液为试剂一。

## 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中的各孔加入 180  $\mu\text{L}$  测定工作液。
- ③ 向步骤②中的各孔加入 40  $\mu\text{L}$  试剂四。
- ④ 振板 5 s, 酶标仪 550 nm 波长下检测各孔 OD 值  $A_1$ 。37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min 后检测各孔 OD 值  $A_2$ ,  $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

## 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
测定工作液( $\mu\text{L}$ )	180	180
试剂四( $\mu\text{L}$ )	40	40
振板 5 s, 酶标仪 550 nm 波长下检测各孔 OD 值 $A_1$ 。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 后检测各孔 OD 值 $A_2$ , $\Delta A = A_2 - A_1$ 。		

本试剂盒检测组织样本时,需测定总蛋白浓度,动物组织蛋白测定推荐使用 BCA 法(货号: E-BC-K318-M),植物组织蛋白测定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 血浆(清)样本中磷脂酶 D(PLD)活力计算公式：

定义：37℃条件下，每升血浆(清)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。

$$\text{PLD 活力 (U/L)} = (\Delta A_{550} - b) \div a \div T \times f \times 1000$$

### ② 组织样本中磷脂酶 D(PLD)活力计算公式：

定义：37℃条件下，每克组织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。

$$\text{PLD 活力 (U/gprot)} = (\Delta A_{550} - b) \div a \div T \times f \div C_{pr} \times 1000$$

#### 注解：

y: 标准品  $\Delta A$ -空白  $\Delta A$  (标准品浓度为 0 时的  $\Delta A$ )

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

$\Delta A_{550}$ : 样本的绝对 OD 值( $\Delta A_{550} = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}$ )

T: 反应时间, 30 min

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

$C_{pr}$ : 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

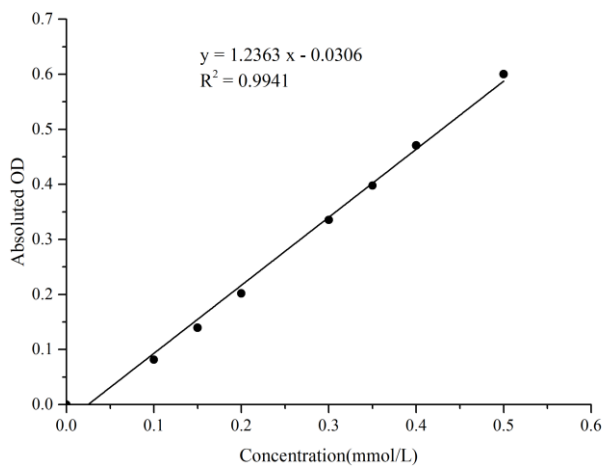
检测范围	0.68-16.73 U/L	批间差	1.8-9.5%
灵敏度	0.68 U/L	批内差	1.7-2.8%
稀释回收率	98-100%		

### 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
A <sub>1</sub>	0.066	0.164	0.200	0.240	0.293	0.318	0.341	0.390
	0.068	0.159	0.200	0.238	0.286	0.316	0.340	0.381
A <sub>2</sub>	0.077	0.257	0.349	0.454	0.642	0.731	0.830	1.005
	0.078	0.250	0.351	0.449	0.629	0.720	0.814	0.988
$\Delta A$ 值	0.011	0.093	0.149	0.214	0.349	0.413	0.489	0.615
	0.010	0.091	0.151	0.211	0.343	0.404	0.474	0.607
平均 $\Delta A$ 值	0.011	0.092	0.150	0.213	0.346	0.409	0.482	0.611
绝对 OD 值	0	0.082	0.140	0.202	0.336	0.398	0.471	0.601

② 绘制标曲(如下图):





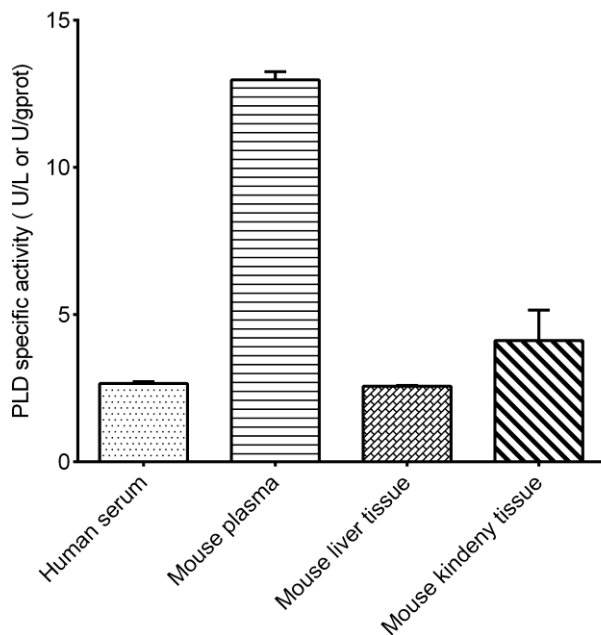
## 附录2 实例分析

例如小鼠肝组织(数据仅供参考):

取20  $\mu\text{L}$  稀释2倍的10%小鼠肝组织匀浆上清加入到酶标板孔中,按操作表操作,结果如下:标准曲线为 $y = 1.2363x - 0.0306$ ,测定孔 $A_1$ 值为0.096,测定孔 $A_2$ 值为0.679,  $\Delta A_{\text{测定}} = A_2 - A_1 = 0.679 - 0.096 = 0.583$ 。空白孔 $A_1$ 值为0.066,空白孔 $A_2$ 值为0.077,  $\Delta A_{\text{空白}} = A_2 - A_1 = 0.077 - 0.066 = 0.011$ ,  $\Delta A_{550} = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}} = 0.583 - 0.011 = 0.572$ 。测定出10%小鼠肝组织匀浆的蛋白浓度为12.54 gprot/L,计算结果为:

$$\text{PLD活力 (U/gprot)} = (0.572 + 0.0306) \div 1.2363 \div 30 \times 2 \div 12.54 \times 1000 = 2.59 \text{ U/gprot}$$

按说明书操作,测定人血清(加样量20  $\mu\text{L}$ )、小鼠血浆(加样量20  $\mu\text{L}$ )、小鼠肝组织(10%组织匀浆蛋白浓度为12.54 gprot/L,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10.47 gprot/L,稀释倍数为2,加样量20  $\mu\text{L}$ )中的PLD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。



