

磷脂 (PLIP) (氧化酶法) 含量检测试剂盒

(货号: G1243W48 微板法 48 样)

一、产品简介:

磷脂在磷脂酶 D 的作用水解生成胆碱和磷脂酸, 胆碱被胆碱氧化酶氧化生成过氧化氢, 过氧化氢与 4-氨基安替比林、DAOS 反应生成蓝色染料。此染料在 600nm 有最大吸收峰, 吸收强度与样本中磷脂含量成正比。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 10mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 2.5mL×1 瓶	4°C保存	
标准管	液体 0.2mL×1 支	4°C保存	浓度为 3.36mmol/L 或 260.1mg/dL。

三、所需仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、离心机、蒸馏水。

四、磷脂 (PLIP) 含量检测:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、组织样本:

称取约 0.1g 组织 (干样可酌情取 0.05g; 水分充足的样本可取 0.5g, 定容至 1mL), 加入 1mL 无水乙醇, 进行冰浴匀浆, 12000rpm, 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取。

2、血清、血浆样本: 新鲜血清或肝素抗凝血浆。

当样本中抗坏血酸≤50mg/dL、直接胆红素≤40mg/dL、总胆红素≤40mg/dL、溶血≤400mg/dL、乳糜≤1.60%时未观察到明显干扰。

3、细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 1000 万细菌或细胞加入 1mL 无水乙醇, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细胞数量 (万): 提取液体积 (mL) 为 1000: 0.5~1 的比例进行提取。

4、上机检测:

① 酶标仪预热 30min, 设置温度在 37°C, 设定波长到 600nm。

② 所有试剂解冻至室温, 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)	标准管 (仅做一次)
样本	2		
蒸馏水		2	
标准品			2
试剂一	160	160	160
混匀, 37°C孵育 3min 后, 于 600nm 处读取 A1。			
试剂二	40	40	40
混匀, 37°C孵育 5min 后, 于 600nm 处读取 A2,			

$$\Delta A = A_2 - A_1。$$

【注】：若 ΔA 值小于 0.005，可增加样本加样体积 V_1 （如由 2 μ L 增至 5 μ L，空白管也由 2 μ L 增至 5 μ L 蒸馏水，标准管仍然为 2 μ L+3 μ L 蒸馏水（总体积同测定管和空白管即 5 μ L）；其他试剂均保持不变），则改变后的 V_1 代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、按照样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{磷脂(PLIP)}(\mu\text{mol/g 鲜重}) &= (C \text{ 标准} \times V_2) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div (W \times V_1 \div V) \times D \\ &= 3.36 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div W \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{磷脂(PLIP)}(\text{mg/g 鲜重}) &= (C \text{ 标准} \times V_2) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div (W \times V_1 \div V) \times D \\ &= 2.601 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div W \times D \end{aligned}$$

2、按照液体体积计算：

$$\begin{aligned} \text{磷脂(PLIP)}(\text{mmol/L}) &= (C \text{ 标准} \times V_2) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div V_1 \times D \\ &= C \text{ 标准} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \times D \end{aligned}$$

3、按照细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{磷脂(PLIP)}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) &= (C \text{ 标准} \times V_2) \times 10^3 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div (500 \times V_1 \div V) \times D \\ &= 3.36 \times 10^3 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div 500 \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{磷脂(PLIP)}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= (C \text{ 标准} \times V_2) \times 10^3 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div (500 \times V_1 \div V) \times D \\ &= 2.601 \times 10^3 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div 500 \times D \end{aligned}$$

C 标准---标品浓度，3.36mmol/L 或 3.36 μ mol/mL 或 2.601mg/mL 或 260.1mg/dL；

V_1 ---加入样本体积，0.002mL；

V_2 ---加入标准品体积，0.002mL；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

V---加入提取液体积，1mL；

500--细胞数量，万。