

脯氨酸（PRO）含量测定试剂盒说明书

微量法 100管/96样

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

Pro广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，逆境条件下，植物体内Pro含量显著增加。Pro增加量在一定程度上反映了抗逆性，抗旱性强的品种往往积累较多的脯氨酸。因此，脯氨酸增加量可以作为抗逆育种的生理指标之一。

测定原理：

用磺基水杨酸（SA）提取Pro，加热处理后，Pro与酸性茚三酮溶液反应生成红色；加甲苯萃取后，在520nm测定吸光度。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、冰乙酸25mL、甲苯50mL、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

提取液：液体100mL×1瓶，4℃保存。

试剂一：冰乙酸25 mL×1瓶，4℃保存。（自备）

试剂二：液体25 mL×1瓶，4℃保存。

试剂三：甲苯50mL×1瓶，4℃保存。（自备）

样品测定的准备：

1、细菌、细胞或组织样品的制备：

细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（10⁴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），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率20%或200W，超声3s，间隔10s，重复30次）；之后置95℃水浴振荡提取10min；10000g，25℃离心10min，取上清，冷却后待测。

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），匀浆；之后置95℃水浴振荡提取10min；10000g，25℃离心10min，取上清，冷却后待测。

2、血清（浆）样品：按照血清（浆）体积（mL）：提取液体积（mL）为1：5~10的比例（建议取0.1mL血清（浆）加入1mL提取液），充分混匀，之后置95℃水浴振荡提取10分钟，10000g，25℃离心10分钟，取上清，冷却后待测。

测定步骤：

1. 分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至520nm，蒸馏水调零。
2. 样本测定：

(1) 取0.25mL样本+0.25mL试剂一+0.25mL试剂二于有盖EP管中，置95℃水浴中保温30min（盖紧，防止水分散失），每10min振荡一次。

(2) 待冷却后，加入0.5mL试剂三，振荡30s，静置片刻，使色素转至试剂三中；吸取0.2mL上层溶液于微量石英比色皿或96孔板中，于520nm波长处比色，记录吸光值A。

Pro含量计算：

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、典型回归方程 $y = 0.0521x - 0.0021$ （x为脯氨酸含量， $\mu\text{g/mL}$ ；y为吸光值A）

2、按照血清（浆）体积计算

$$\text{Pro含量}(\mu\text{g/mL})=[(A+0.0021) \div 0.0521 \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) = 192 \times (A+0.0021)$$

3、按照蛋白浓度计算

$$\text{Pro含量}(\mu\text{g/mg prot})=[(A+0.0021) \div 0.0521 \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) = 19.2 \times (A+0.0021) \div \text{Cpr}$$

4、按照样本质量计算

$$\text{Pro含量}(\mu\text{g/g鲜重}) = [(A+0.0021) \div 0.0521 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 19.2 \times (A+0.0021) \div W$$

5、按照细菌或细胞密度计算

$$\text{Pro含量}(\mu\text{g}/104 \text{ cell})=[(A+0.0021) \div 0.0521 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.0384 \times (A+0.0021)$$

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.25mL; V2: 加入提取液体积, 1 mL; V3: 加入血清（浆）体积, 0.1 mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500万。

b.用96孔板测定的计算公式如下

1、典型回归方程 $y = 0.02605x - 0.0021$ (x为脯氨酸含量, $\mu\text{g/mL}$; y为吸光值A)

2、按照血清（浆）体积计算

$$\text{Pro含量}(\mu\text{g/mL})=[(A+0.0021) \div 0.02605 \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) = 384 \times (A+0.0021)$$

3、按照蛋白浓度计算

$$\text{Pro含量}(\mu\text{g/mg prot})=[(A+0.0021) \div 0.02605 \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) = 38.4 \times (A+0.0021) \div \text{Cpr}$$

4、按照样本质量计算

$$\text{Pro含量}(\mu\text{g/g鲜重}) = [(A+0.0021) \div 0.02605 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 38.4 \times (A+0.0021) \div W$$

3、按照细菌或细胞密度计算

$$\text{Pro含量}(\mu\text{g}/104 \text{ cell})=[(A+0.0021) \div 0.02605 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.0769 \times (A+0.0021)$$

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.25mL; V2: 加入提取液体积, 1 mL; V3: 加入血清（浆）体积, 0.1 mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500万。

注意：最低检测限为1 $\mu\text{g/mL}$ 或1 $\mu\text{g/g}$ 鲜重 或0.01 $\mu\text{g/mg prot}$