

脯氨酸脱氢酶 (Proline dehydrogenase, ProDH)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：

ProDH是存在于线粒体内的催化脯氨酸降解的关键酶。脯氨酸是分布最广泛的一种渗透物质，在胁迫条件下很多植物可以通过增加合成、减少降解而在体内累积大量脯氨酸，降低ProDH活性对于调节渗透平衡、防止渗透胁迫对植物造成伤害、清除自由基、保护细胞结构具有重要意义。

测定原理：

利用异硫氰酸甲酯检测ProDH催化的脱氢反应，600nm处吸光值的吸光值的变化反映酶活性的高低。

需自备的仪器和用品：

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

试剂的组成和配制：

提取液：100mL×1瓶，4℃保存；

试剂一：液体2 mL×1支，4℃保存；

试剂二：液体25mL×1瓶，4℃保存；

试剂三：粉剂×1瓶，4℃保存；临用前加入4mL蒸馏水充分溶解待用，用不完的试剂4℃保存；

试剂四：粉剂×1瓶，4℃保存；临用前加入4mL蒸馏水充分溶解待用，用不完的试剂4℃保存；

试剂五：粉剂×4支，4℃保存；

粗酶液提取：

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样本，加入1mL提取液），进行冰浴匀浆，1500g 4℃离心15min，取上清液于一支新的EP管中，加入一滴试剂一（用10μL的枪头加入），涡旋混匀，冰浴放置30min后，16000g 4℃离心20min，取上清置冰上待测。

测定步骤：

1. 分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至600nm，蒸馏水调零。
2. 样本测定

(1) **混合液的配制**：首先将试剂三和试剂四配成溶液（见试剂的组成和配制），临用前根据用量按照试剂二（V）：试剂三（V）：试剂四（V）=2.4（mL）：0.3（mL）：0.3（mL）的比例充分混匀。（**注意：现配现用，用多少配多少**），置于30℃水浴5min；

(2) 试剂五的配制：取试剂五一支，临用前加入500μL蒸馏水充分溶解待用，现配现用。

(3) 在微量石英比色皿或96孔板中加入35μL样本、15μL试剂五和150μL混合液，混匀，立即记录600nm处初始吸光值A1和10min后的吸光值A2，计算 $\Delta A=A_2-A_1$ 。

ProDH活性计算:

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1) 按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每分钟每mg组织蛋白在每mL反应体系中使600nm处吸光值变化0.01为一个酶活力单位。

$$\text{ProDH (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div 0.01 \div T = 57.14 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算:

单位定义: 每分钟每g组织在每mL反应体系中使600nm处吸光值变化0.01为一个酶活力单位。

$$\text{ProDH (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 57.14 \times \Delta A \div W$$

V反总: 反应体系总体积, 0.2mL; V样: 加入样本体积, 0.035mL; V样总: 加入提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 10 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g。

b.用96孔板测定的计算公式如下

(1) 按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每分钟每mg组织蛋白在每mL反应体系中使600nm处吸光值变化0.005为一个酶活力单位。

$$\text{ProDH (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div 0.005 \div T = 114.29 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算:

单位定义: 每分钟每g组织在每mL反应体系中使600nm处吸光值变化0.005为一个酶活力单位。

$$\text{ProDH (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.005 \div T = 114.29 \times \Delta A \div W$$

V反总: 反应体系总体积, 0.2mL; V样: 加入样本体积, 0.035mL; V样总: 加入提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 10 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g。