

吡咯啉-5-羧酸合成酶（P5CS）试剂盒说明书

微量法 100管/48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：

脯氨酸是植物体内适应逆境胁迫的一种重要的渗透调节物质。高等植物中脯氨酸代谢因其初始底物不同，分为谷氨酸(Glu) 和鸟氨酸(Orn) 两条合成途径。吡咯啉-5-羧酸合成酶（P5CS， Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase）是以谷氨酸为前体合成脯氨酸途径的关键酶，对植物适应逆境胁迫起关键作用。

测定原理：

吡咯啉-5-羧酸合成酶催化谷氨酸生成P5C过程中分解ATP生成ADP和无机磷，通过钼酸铵比色法测定单位时间内产生无机磷的量可确定P5CS活性。

需自备的仪器和用品：

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

试剂组成和配制：

试剂一：液体60 mL×1瓶，4℃保存；

试剂二：液体12 mL×1瓶，4℃保存；

试剂三：液体12 mL×1瓶，4℃保存；

试剂四：粉剂×1瓶，4℃保存，用时加入25 mL蒸馏水，溶解后4℃保存一周；

试剂五：粉剂×1瓶，4℃保存，用时加入25 mL蒸馏水，溶解后4℃保存一周；

试剂六：液体25mL×1瓶，室温保存；

试剂七：10mmol/L标准磷贮备液10mL×1瓶，4℃保存。

0.5 μ mol/mL 标准磷应用液配制：将试剂七 20倍稀释，即取 0.1mL试剂七加1.9mL蒸馏水充分混匀。

定磷剂的配制：按H₂O: 试剂四:试剂五:试剂六=2:1:1:1 的比例配制，配好的定磷剂应为浅黄色。若无色则试剂失效，若是蓝色则为磷污染，定磷剂现用现配。

注意：配试剂最好用新的烧杯、玻棒和玻璃移液器，也可以用一次性塑料器皿，避免磷污染。

样品酶液的制备：

1、组织样品：按照组织质量（g）：试剂一体积(mL)为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL试剂一），进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

2、血清（浆）样品：直接检测。

操作步骤

1、分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至660nm。

2、酶促反应（在EP管中加入下列试剂）

	对照管	测定管
--	-----	-----

试剂二 (μL)		100
样本 (μL)		100

混匀, 37°C (哺乳动物) 或25°C (其他物种) 准确水浴10min

试剂三 (μL)	100	100
试剂二 (μL)	100	
样本 (μL)	100	

混匀, 8000g, 25°C离心10min, 取上清液

3、定磷 (在EP管或96孔板中加入下列试剂)

	空白管	标准管	对照管	测定管
0.5μmol/ml标准磷应用液 (μL)		20		
上清液 (μL)			20	20
蒸馏水 (μL)	20			
定磷试剂 (μL)	200	200	200	200

混匀, 室温放置30min, 在 660nm处, 记录各管吸光值。

注意:

- 1、由于每一个样都必须做对照, 本试剂盒100管保证测 48份P5CS活性。
- 2、此法具有微量、灵敏、快速的特点。所以对测定所用试管要求严格无磷。
- 3、空白管和标准管只要做一管。每个测定管设一个对照管。

计算

1、血清 (浆) P5CS活力的计算:

单位定义: 每小时每毫升血清 (浆) 中P5CS 消耗ATP 产生1μmol无机磷的量为一个酶活力单位。

$P5CS \text{ 活力 } (\mu\text{mol/h/mL}) = C_{\text{标准管}} \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \times V_{\text{总}} \div V_{\text{样}} \div T = 9 \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}})$

2、组织中P5CS活力的计算:

(1) 按蛋白浓度计算:

单位定义: 每小时每毫克组织蛋白中P5CS消耗ATP 产生1μmol无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{P5CS活力}(\mu\text{mol/h /mg prot}) = \frac{C_{\text{标准管}} \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \times V_{\text{总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T}{9} \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算:

单位定义: 每小时每克组织中P5CS消耗ATP 产生1 μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。P5CS活力($\mu\text{mol/h /g}$ 鲜重) =
$$\frac{C_{\text{标准管}} \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \times V_{\text{总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T}{9} \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \div W$$

C标准管: 标准管浓度, 0.5 $\mu\text{mol/mL}$; V总: 酶促反应总体积, 0.3mL; V样: 加入样本体积, 0.1mL ; V样总: 加入提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 1/6小时; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本鲜重, g。

www.affandi-e.com