

脯氨酸 (PRO) 含量测定试剂盒说明书

(货号: G0111W48 微板法 48 样)

一、产品简介:

植物体内游离脯氨酸含量在一定程度上反映了植物的抗逆性,抗旱性强的品种往往积累较多的脯氨酸。因此测定脯氨酸含量可以作为抗旱育种的生理指标。另外,由于脯氨酸亲水性极强,能稳定原生质胶体及组织内的代谢过程,因而能降低凝固点,有防止细胞脱水的作用。在低温条件下,植物组织中脯氨酸含量增加,可提高植物的抗寒性,因此,亦可作为抗寒育种的生理指标。

当用磺基水杨酸提取植物样品时,脯氨酸便游离于磺基水杨酸的溶液中,然后与酸性茚三酮加热反应后形成红色物质,该红色物质在 520nm 处有最大吸收峰,进而通过比色法测定植物体内游离脯氨酸的含量。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	使用前摇匀。
试剂一	液体 18mL×1 瓶	4°C保存	若有沉淀, 50°C水浴加热两分钟使其溶解, 用前摇匀。
标准品	粉体 mg×1 支	4°C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、冰醋酸 (乙酸)、研钵、冰。

四、脯氨酸 (PRO) 含量的测定:

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

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 转移至 EP 管后, 于 90°C 水浴振荡提取 10min; 冷却至室温后, 于 25°C×12000 rpm, 离心 10min, 取上清作为待测样品。

【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 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 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 在 4°C 或冰浴进行匀浆 (使用各类常见电动匀浆器或超声破碎)。于 90°C 水浴振荡提取 10min; 冷却至室温后, 于 25°C×12000 rpm, 离心 10min, 取上清作为待测样品。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10⁴): 提取液 (mL) 为 500~1000:1 的比例进行提取。

③ 液体样本:

取 0.1mL 液体样本加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 转移至 EP 管后, 于 90°C 水浴振荡提取 10 min, 冷却至室温后, 于 25°C×12000 rpm, 离心 10min, 取上清作为待测样品。

【注】: 若增加样本量, 可按照液体体积 (mL): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例提取。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 520nm。

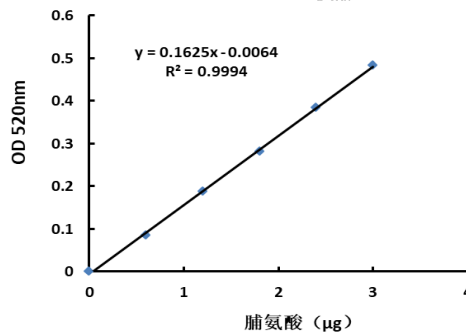
② 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
样本	150	
蒸馏水		150
冰醋酸	150	150
试剂一	300	300

置 95°C 水浴中加热 30min (盖紧封口, 防止盖子爆开水分散失), 冷却至室温。吸取 200μL 澄清液体于 96 孔板中, 立即于 520nm 读取吸光值 A, $\Delta A = A_{测定} - A_{空白}$ 。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.1625x - 0.0064$; x 为标准品质量 (μg); y 为 ΔA 。



2、按照样本质量计算:

$$\begin{aligned} \text{脯氨酸 (Pro) 含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0064) \div 0.1625] \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 41.03 \times (\Delta A + 0.0064) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按细菌/细胞数量计算:

$$\begin{aligned} \text{脯氨酸 (Pro) 含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0064) \div 0.1625] \div (500 \times V1 \div V) \times D \\ &= 41.03 \times (\Delta A + 0.0064) \div 500 \times D \end{aligned}$$

4、按照液体体积计算:

$$\begin{aligned} \text{脯氨酸 (Pro) 含量}(\mu\text{g}/\text{mL}) &= [(\Delta A + 0.0064) \div 0.1625] \div [V2 \times V1 \div (V + V2)] \times D \\ &= 451.3 \times (\Delta A + 0.0064) \times D \end{aligned}$$

V---提取液的总体积, 1mL;

V1---加入反应体系提取液的体积, 0.15mL;

V2---液体样品量, 0.1mL;

W---样品质量, g。

500---细胞数量, 万;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (1mg/mL): 标准品溶解在 1mL 蒸馏水中, 充分混匀。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品: 0, 4, 8, 12, 16, 20 μg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的加样表操作, 根据结果即可制作标准曲线。