

## 脯氨酸脱氢酶（PDH）试剂盒说明书

（货号：G1101W 微板法 96 样）

### 一、产品简介：

脯氨酸脱氢酶(proline dehydragenase, PDH, EC 1.5.1.2) 催化脯氨酸生成  $\Delta^1$ -二氢吡咯-5-羧酸的反应，是脯氨酸降解过程的限速步骤。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 PDH 活性对于防止渗透胁迫对植物造成伤害、保护细胞结构等方面具有重要意义。

脯氨酸脱氢酶(PDH)催化脯氨酸脱氢并使  $\text{NAD}^+$  还原成 NADH，通过检测 NADH 在 340nm 处的增加速率即可得出 PDH 酶活性大小。

### 二、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉体 mg×1 支	4°C保存	临用前甩几下，使粉体落到底部，再加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用
试剂二	液体 15mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	粉体 mg×1 支	4°C保存	临用前甩几下，使粉体落到底部，再加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用

### 三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

### 四、脯氨酸脱氢酶（PDH）活性测定：

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：

称取约 0.1g 组织样本，加入 1mL 提取液，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、上机检测：

- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。
- ② 所有试剂解冻至室温（25°C）。
- ③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称（ $\mu\text{L}$ ）	测定管
样本	40
试剂一	10
试剂二	140
试剂三	10
轻轻混匀，室温（25°C）下，可先孵育 6min 后于 340nm 处读取 A1，30min 后读取 A2， $\Delta A=A2-A1$ 。	

### 五、结果计算：

#### 1、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白在每分钟内生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 53.6 \times \Delta A \div Cpr$$

#### 2、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织在每分钟内生成 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 53.6 \times \Delta A \div W$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V2---反应体系总体积， $2 \times 10^4$  L；

$\epsilon$ ---NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  L / mol / cm；

W---样本质量，g；

Cpr---蛋白浓度 (mg/mL)，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒。

V1---加入样本体积，0.04mL；

d---96 孔板光径，0.5cm；

T---反应时间，30min；