

Δ1-吡咯啉-5-羧酸合成酶 (P5CS) 试剂盒说明书

(货号: G1104F 紫外分光法 24 样)

一、产品简介:

Δ1-吡咯啉-5-羧酸合成酶 (P5CS) 是植物体内脯氨酸生物合成的关键酶, 同时也是植物在遭受胁迫时脯氨酸合成的限速酶; 脯氨酸作为一种渗透调节物质, 与植物对干旱和盐胁迫的适应性密切相关。所以 P5CS 在调节脯氨酸的代谢水平上具有重要作用。

Δ1-吡咯啉-5-羧酸合成酶 (P5CS) 催化谷氨酸转化成γ-谷氨酸半醛, 同时使 NADPH 氧化成 NADP⁺, 通过检测 NADPH 在 340nm 处的下降速率, 即可得出 P5CS 酶活性大小。

二、试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 30mL×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	粉体 mg×2 支	4°C 保存	临用前甩几下, 使粉体落到底部, 每支分别加入 0.6mL 蒸馏水溶解备用, 用不完的试剂分装后-20°C 保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂三	液体 26mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂四	粉体 mg×2 支	-20°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, 可-20°C 分装保存。

三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、水浴锅、离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、Δ1-吡咯啉-5-羧酸合成酶 (P5CS) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样本情况, 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:

取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 冰浴匀浆, 12000rpm, 4°C 离心 10min, 取上清液待用。

【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; 取约 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 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10⁶): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 澄清的液体样本直接检测, 若浑浊则离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 紫外分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C), 或可放在 25°C 条件下水浴 15min 左右。

③ 试剂一和二和三和四可按照 20:20:520:20 比例配成混合液 (一枪加 580μL 该混合液) (该

混合液用多少配多少，现配现用）。

- ④ 制备对照管样本：取出同一个样本的部分上清液至一新 EP 管中，于 95°C 水浴中煮沸 10min 后取出，冷却至室温后于 12000rpm，4°C 或者室温离心 10min，取离心后的上清液作为该样本的对照管样本备用。
- ⑤ 在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	120	120 (煮沸的样本)
试剂一	20	20
试剂二	20	20
试剂三	520	520
试剂四	20	20

混匀，室温（25°C）下，30s 时立即于 340nm 处分别读取吸光值 A1，10min 后读取 A2， $\Delta A = (A1 - A2)$ 测定 - (A1 - A2) 对照（每个样本需做一个自身对照）。

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氧化 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$P5CS \text{ 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 93.8 \times \Delta A \div Cpr$$

2、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织在每分钟内氧化 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$P5CS \text{ 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 93.8 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌/细胞数量计算：

单位定义：每 10⁴ 个细胞在每分钟内氧化 1nmol NADPH 定义为一个酶活单位 (U)。

$$P5CS \text{ 活性}(\text{nmol}/\text{min} / 10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.188 \times \Delta A$$

4、液体中 P5CS 活力的计算：

单位定义：每毫升液体在每分钟内氧化 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$P5CS \text{ 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T = 93.8 \times \Delta A$$

V---提取液体积，1mL；

V1---加入反应体系中样本体积，0.12mL；

V2---反应体系总体积：7×10⁻⁴ L；

d---光径，1cm；

T---反应时间，10min；

W---样本质量，g；

500---细胞数量，万；

ε---NADPH 摩尔消光系数，6.22×10³ L / mol /cm；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。