

## Δ1-吡咯啉-5-羧酸合成酶 (P5CS) 试剂盒说明书

(货号: G1104W 微板法 48 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<sup>+</sup>, 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 60mL×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 13mL×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:

酶标仪、96 孔板、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 (10<sup>4</sup>): 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 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), 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 10:10:130:10 比例配成混合液 (一枪加 160μL 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 96 孔板中依次加入：

试剂名称(μL)	测定管	对照管
样本	40	40 (煮沸的样本)
试剂一	10	10
试剂二	10	10
试剂三	130	130
试剂四	10	10

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。

$$P5CS \text{ 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 160.8 \times \Delta A \div Cpr$$

### 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。

$$P5CS \text{ 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 160.8 \times \Delta A \div W$$

### 3、按细菌/细胞数量计算：

单位定义：每 10<sup>4</sup> 个细胞在每分钟内氧化 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位（U）。

$$P5CS \text{ 活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.322 \times \Delta A$$

### 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。

$$P5CS \text{ 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T = 160.8 \times \Delta A$$

V---提取液体积，1mL；

V1---加入反应体系中样本体积，0.04mL；

V2---反应体系总体积：2×10<sup>-4</sup> L；

d---96 孔板光径，0.5cm；

T---反应时间，10min；

W---样本质量，g；

500---细胞数量，万；

$\epsilon$ ---NADPH 摩尔消光系数，6.22×10<sup>3</sup> 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。