

## 脯氨酸脱氢酶 ( Proline dehydrogenase, ProDH)试剂盒说明书

微量法 100 管/96 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：

ProDH 是存在于线粒体内的催化脯氨酸降解的关键酶。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 ProDH 活性对于调节渗透平衡、防止渗透胁迫对植物造成伤害、清除自由基、保护细胞结构具有重要意义。

### 测定原理：

利用异硫氰酸甲酯检测 ProDH 催化的脱氢反应，600nm 处吸光值的吸光值的变化反映酶活性的高低。

### 组成：

产品名称	AC012-100T/96S	Storage
提取液：液体	100ml	4℃
试剂一：液体	2ml	4℃
试剂二：液体	25ml	4℃
试剂三：粉剂	1 瓶	4℃
试剂四：粉剂	1 瓶	4℃
试剂五：粉剂	4 瓶	4℃
说明书	1 份	

试剂三临用前加入 4ml 蒸馏水充分溶解待用，用不完的试剂 4℃ 保存；

试剂四临用前加入 4ml 蒸馏水充分溶解待用，用不完的试剂 4℃ 保存；

### 自备仪器和用品：

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

### 粗酶液提取：

按照组织质量 (g)：提取液体积(ml)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 样本，加入 1ml 提取液），进行冰浴匀浆，1500g 4℃ 离心 15min，取上清液于一支新的 EP 管中，加入一滴试剂一（用 10 $\mu$ l 的枪头加入），涡旋混匀，冰浴放置 30min 后，16000g 4℃ 离心 20min，取上清置冰上待测。

### 测定步骤：

- 1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 600nm，蒸馏水调零。
- 2、样本测定

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



(1) 混合液的配制：首先将试剂三和试剂四配成溶液（见试剂的组成和配制），临用前根据用量按照试剂二（V）：试剂三（V）：试剂四（V）=2.4（ml）：0.3（ml）：0.3（ml）的比例充分混匀。（注意：现配现用，用多少配多少），置于30℃水浴5min；

(2) 试剂五的配制：取试剂五一支，临用前加入500μl蒸馏水充分溶解待用，现配现用。

(3) 在微量石英比色皿或96孔板中加入35μl样本、15μl试剂五和150μl混合液，混匀，立即记录600nm处初始吸光值A1和10min后的吸光值A2，计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

### ProDH 活性计算：

#### a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每分钟每mg组织蛋白在每ml反应体系中使600nm处吸光值变化0.01为一个酶活力单位。

$$\text{ProDH (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div 0.01 \div T = 57.14 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算：

单位定义：每分钟每g组织在每ml反应体系中使600nm处吸光值变化0.01为一个酶活力单位。

$$\text{ProDH (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 57.14 \times \Delta A \div W$$

V反总：反应体系总体积，0.2ml；V样：加入样本体积，0.035ml；V样总：加入提取液体积，1ml；  
T：反应时间，10min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/ml；W：样本质量，g。

#### b.用96孔板测定的计算公式如下

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每分钟每mg组织蛋白在每ml反应体系中使600nm处吸光值变化0.005为一个酶活力单位。

$$\text{ProDH (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div 0.005 \div T = 114.29 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算：

单位定义：每分钟每g组织在每ml反应体系中使600nm处吸光值变化0.005为一个酶活力单位。

$$\text{ProDH (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.005 \div T = 114.29 \times \Delta A \div W$$

V反总：反应体系总体积，0.2ml；V样：加入样本体积，0.035ml；V样总：加入提取液体积，1ml；  
T：反应时间，10min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/ml；W：样本质量，g。

