

吡咯啉-5-羧酸合成酶 (P5CS) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 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:

脯氨酸是植物体内适应逆境胁迫的一种重要的渗透调节物质。高等植物中脯氨酸代谢因其初始底物不同,分为谷氨酸(Glu)和鸟氨酸(Orn)两条合成途径。

吡咯啉-5-羧酸合成酶(P5CS, Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase)是以谷氨酸为前体合成脯氨酸途径的关键酶,对植物适应逆境胁迫起关键作用。

测定原理:

吡咯啉-5-羧酸合成酶催化谷氨酸生成 P5C 过程中分解 ATP 生成 ADP 和无机磷,通过钼酸铵比色法测定单位时间内产生无机磷的量可确定 P5CS 活性。

组成:

产品名称	AC023-50T/24S	Storage
试剂一: 液体	60ml	4°C
试剂二: 液体	6ml	4°C
试剂三: 液体	6ml	4°C
试剂四: 粉剂	1 瓶	4°C
试剂五: 粉剂	1 瓶	4°C
试剂六: 液体	25ml	RT
试剂七: 10mmol/L 标准磷贮备液	10ml	4°C
说明书	1 份	

试剂四用时加入 25 ml 蒸馏水,溶解后 4°C 保存一周;

试剂五用时加入 25 ml 蒸馏水,溶解后 4°C 保存一周;

0.5 μ mol/ml 标准磷应用液配制:

将试剂七 20 倍稀释,即取 0.1ml 试剂七加 1.9ml 蒸馏水充分混匀。

定磷剂的配制:

按 H₂O: 试剂四:试剂五:试剂六=2:1:1:1 的比例配制,配好的定磷剂应为浅黄色。若无色则试剂失效,若是蓝色则为磷污染,定磷剂现用现配。

注意:配试剂最好用新的烧杯、玻棒和玻璃移液器,也可以用一次性塑料器皿,避免磷污染。

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



自备仪器和用品：

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1ml 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

样品酶液的制备：

- 1、组织样品：按照组织质量 (g) : 试剂一体积(ml)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1ml 试剂一), 进行冰浴匀浆。8000g 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
- 2、血清 (浆) 样品：直接检测。

操作步骤：

- 1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 660nm。
- 2、酶促反应 (在 EP 管中加入下列试剂)

	对照管	测定管
试剂二 (μl)		100
样本 (μl)		100

混匀, 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其他物种) 准确水浴 10min

试剂三 (μl)	100	100
试剂二 (μl)	100	
样本 (μl)	100	

混匀, 8000g, 25°C离心 10min, 取上清液

- 3、定磷 (在 EP 管或 96 孔板中加入下列试剂)

	空白管	标准管	对照管	测定管
0.5μmol/ml 标准磷应用液 (μl)		100		
上清液 (μl)			100	100
蒸馏水 (μl)	100			
定磷试剂 (μl)	1000	1000	1000	1000

混匀, 室温放置 30min, 在 660nm 处, 记录各管吸光值。

注意：

- 1、由于每一个样都必须做对照, 本试剂盒 50 管保证测 24 份 P5CS 活性。
- 2、此法具有微量、灵敏、快速的特点。所以对测定所用试管要求严格无磷。
- 3、空白管和标准管只要做一管。每个测定管设一个对照管。

计算

- 1、血清 (浆) P5CS 活力的计算:

单位定义：每小时每毫升血清 (浆) 中 P5CS 消耗 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。



$$\text{P5CS 活力 } (\mu\text{mol/h/ml}) = \frac{C \text{ 标准管} \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \times V_{\text{总}} \div V_{\text{样}} \div T = 9 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})$$

2、组织中 P5CS 活力的计算:

(1) 按蛋白浓度计算:

单位定义: 每小时每毫克组织蛋白中 P5CS 消耗 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{P5CS 活力} (\mu\text{mol/h/mg prot}) = \frac{C \text{ 标准管} \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \times V_{\text{总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 9 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算:

单位定义: 每小时每克组织中 P5CS 消耗 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{P5CS 活力} (\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = \frac{C \text{ 标准管} \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \times V_{\text{总}} \div (W \times V_{\text{样}}) \div T = 9 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div W$$

C 标准管: 标准管浓度, 0.5 $\mu\text{mol/ml}$; V 总: 酶促反应总体积, 0.3ml; V 样: 加入样本体积, 0.1ml ; V 样总: 加入提取液体积, 1ml; T: 反应时间, 1/6 小时; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/ml; W: 样本鲜重, g。

