

吡咯啉-5-羧酸合成酶 (P5CS) 试剂盒说明书

微量法 100T/48S

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, $\Delta 1$ -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	AC024-100T/48S	Storage
试剂一: 液体	60ml	4°C
试剂二: 液体	12 ml	4°C
试剂三: 液体	12 ml	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：

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、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℃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℃（哺乳动物）或 25℃（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℃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
0.5 $\mu\text{mol/ml}$ 标准磷应用液（ μl ）		20		
上清液（ μl ）			20	20
蒸馏水（ μl ）	20			
定磷试剂（ μl ）	200	200	200	200

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 100 管保证测 48 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 1 μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

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

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



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 μ mol 无机磷的量为一个酶活力单位。

P5CS 活力(μ mol/h /mg prot)=C 标准管 \times (A 测定管-A 对照管) \div (A 标准管-A 空白管) \times V 总 \div (Cpr \times V 样) \div T = 9 \times (A 测定管-A 对照管) \div (A 标准管-A 空白管) \div Cpr

(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 μ mol 无机磷的量为一个酶活力单位。

P5CS 活力(μ mol/h /g 鲜重)=C 标准管 \times (A 测定管-A 对照管) \div (A 标准管-A 空白管) \times V 总 \div (W \times V 样 \div V 样总) \div T = 9 \times (A 测定管-A 对照管) \div (A 标准管-A 空白管) \div W

C 标准管：标准管浓度，0.5 μ 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。

