

Δ 1-吡咯啉-5-羧酸合成酶 (P5CS) 试剂盒说明书

(微板法 48 样)

一、产品简介:

Δ 1-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。

Δ 1-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 NADP⁺还原成 NADPH, 通过检测 NADPH 在 340nm 处的增加速率, 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℃ 保存	
试剂一	粉体 mg×1 支	4℃ 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	-20℃ 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℃ 保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂三	液体 13mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	粉体 mg×1 支	4℃ 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。

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、Δ 1-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℃ 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℃ 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 (10⁴): 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。

③ 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	40	40
试剂一	10	10
试剂二	10	10

试剂三	130	140
试剂四	10	
混匀，室温（25℃）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）。		

- 【注】1. 若 ΔA 的值在零附近徘徊，则可延长反应时间 T（如增至 40min 或更长），或加大样本量 V1（如增至 60 μ L，则试剂三相应减少），则改变后的反应（孵育）时间 T 或加样体积 V1 需代入计算公式重新计算。
2. 若起始值 A1 太大如超过 2（如颜色较深的植物叶片，一般色素较高，则起始值相对会偏高），可以适当减少样本加样量（则试剂三相应增加），则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。

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。

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

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。

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

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）。

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

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。

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

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 $\times 10^{-4}$ L；

d---96 孔板光径，0.5cm；

T---反应时间，10min；

W---样本质量，g；

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数，6.22 $\times 10^3$ 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。