

## 脯氨酸脱氢酶（ProDH）活性检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA1094

产品规格：100管/96样

### 产品简介：

ProDH是存在于线粒体内的催化脯氨酸降解的关键酶。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。

ProDH催化脯氨酸脱氢生成延丙酮酸，脱下的氢通过吩嗪二甲酯硫酸（PMS）传递还原2,6-二氯酚靛酚（DCPIP），并且在600nm处具有特征吸收峰，通过600nm吸光度的下降，测定2,6-DCPIP的还原速度，代表ProDH活性。

**注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

### 试验中所需的仪器和试剂：

天平、低温离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96孔板、丙酮、匀浆器/研钵、冰、蒸馏水。

### 产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体100mL×1瓶	2-8℃
提取液二	液体1.2mL×1支	2-8℃
试剂一	液体20mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×1瓶	2-8℃
试剂三	粉剂×1瓶	2-8℃
标准品	粉剂×1瓶	-20℃

### 溶液的配制：

1. 试剂二：临用前加入2.5mL蒸馏水充分溶解待用，用不完的试剂4℃保存；
2. 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；
3. 试剂四：临用前加入5mL蒸馏水充分溶解待用，用不完的试剂可分装-20℃保存，避免反复冻融。
4. 工作液的配制：首先将试剂三和试剂四配成溶液，临用前根据用量按照试剂一（V）：试剂二（V）：试剂三（V）=1.6（mL）：0.2（mL）：0.15（mL）的比例充分混匀。（注意：现配现用，用多少配多少）

### 操作步骤（仅供参考）：

#### 一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 组织：按照组织质量（g）：提取液一体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g样本，加入1mL提取液一），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10μL提取液二，涡旋混匀，冰浴放置30min后，15000g 4℃离心20min，取上清置冰上待测。
2. 细胞或细菌：按照细胞数量（10<sup>4</sup>个）：提取液一体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细胞加入1mL提取液一），冰浴匀浆，1500g 4℃离心15min，取上清液于一支新的EP管中，加入10μL提取液二，涡旋混匀，冰浴放置30min后，15000g 4℃离心20min，取上清置冰上待测。

#### 二、测定步骤

1. 分光光度计/酶标仪预热30min以上，波长调至600nm，分光光度计蒸馏水调零。
2. 工作液置于37℃（哺乳动物）或25℃（其他物种）水浴5min。
3. 加样表（在微量玻璃比色皿/96孔板中分别加入下列试剂）

试剂名称（μL）	测定管	空白管
工作液	160	160
试剂四	20	20



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

样本	20	-
蒸馏水	-	20

在微量玻璃比色皿/96孔板中分别加入上述试剂，充分混匀后于600nm处测定10s时的吸光值，迅速置于37℃（哺乳动物）或25℃（其他物种）水浴3min，拿出迅速擦干测定190s时的吸光值（有控温功能的酶标仪可以将温度设置为25℃或者37℃），空白管10s和190s的吸光度分别记为A1、A2，测定管10s和190s的吸光度记为A3、A4。计算 $\Delta A_{测定} = A3 - A4$ ， $\Delta A_{空白} = A1 - A2$ ， $\Delta A = \Delta A_{测定} - \Delta A_{空白}$ （空白管只需做1-2次）。

## 二、ProDH酶活计算

### A、按微量玻璃比色皿计算

#### 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。

$$\text{ProDH (U/mg prot)} = \Delta A \div 0.01 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 333.33 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

#### 2. 按样本质量计算：

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。

$$\text{ProDH (U/g 质量)} = \Delta A \div 0.01 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 333.33 \times \Delta A \div W$$

#### 3. 按细胞数量计算：

单位定义：每分钟每1万个细胞在每mL反应体系中使600nm处吸光值变化0.01为一个酶活力单位。

$$\text{ProDH (U/10}^4\text{cell)} = \Delta A \div 0.01 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.67 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积，0.2mL；V样：加入样本体积，0.02mL；V样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，3min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：500万个细胞。

### B、按96孔板计算

#### 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。

$$\text{ProDH (U/mg prot)} = \Delta A \div 0.005 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 666.67 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

#### 2. 按样本质量计算：

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。

$$\text{ProDH (U/g 质量)} = \Delta A \div 0.005 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 666.67 \times \Delta A \div W$$

#### 3. 按细胞数量计算：

单位定义：每分钟每1万个细胞在每mL反应体系中使600nm处吸光值变化0.005为一个酶活力单位。

$$\text{ProDH (U/10}^4\text{cell)} = \Delta A \div 0.005 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.33 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积，0.2mL；V样：加入样本体积，0.02mL；V样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，3min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：500万个细胞。

### 注意事项：

1.  $\Delta A$  大于 0.6 时或者 A3 大于 1.5 时建议将样本上清用蒸馏水稀释后再进行测定。
2. 控制 A3 在 0.8 以上（96 孔板在 0.4 以上），若 A3 小于 0.8（用 96 孔板数值小于 0.4 时），建议将样本上清用蒸馏水稀释后再进行测定。
3. 空白管为检测各试剂组分质量的检测孔，正常情况下，变化不超过 0.02。



扫一扫 加微信

**郑州乐业生物科技有限公司**

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com