

## 吡咯啉-5-羧酸合成酶 (P5CS) 活性检测试剂盒 (微量法)

产品货号: BA2009

产品规格: 100T/96S

### 产品简介:

在干旱、盐渍化、重金属、紫外线等不同的胁迫条件下,均会诱导植物体内脯氨酸的积累,对植物起到保护作用。高等植物中,脯氨酸的合成有两条途径,分别以谷氨酸和鸟氨酸为前体。谷氨酸途径主要负责胁迫条件下脯氨酸的积累,而鸟氨酸途径主要在氮充足条件下起作用,与胁迫情况下脯氨酸的积累没有关系。

吡咯啉-5-羧酸合成酶(P5CS)是脯氨酸的谷氨酸合成途径中的关键酶,P5CS是一个双功能酶,在NADPH和ATP作用下,可催化谷氨酸磷酸化及谷氨酸 $\gamma$ -半醛还原,通过测定NADPH在340nm处吸光度的变化,可计算出P5CS的活性高低。

**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。

### 产品组成:

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体110mL×1瓶	2-8℃
提取液二	液体1.1mL×1瓶	-20℃
试剂一	液体15mL×1瓶	2-8℃
试剂二	液体5mL×1瓶	2-8℃
试剂三	粉剂×3支	-20℃
试剂四	粉剂×1瓶	-20℃

### 溶液的配制:

1. 试剂三: 临用前取1支加入0.833mL蒸馏水溶解,现配现用。-20℃分装保存;-20℃保存一周;
2. 试剂四: 临用前加入3mL蒸馏水溶解,现配现用。-20℃分装保存;-20℃保存一周。

### 需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、微量石英比色皿/96孔UV板、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水、EP管。

### 操作步骤:

#### 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)

组织样本:按质量(g):提取液体积(mL)1:5~10比例(建议称取0.1g样本,加入1.0mL提取液一)加入提取液一,冰浴匀浆后加入10 $\mu$ L提取液二,于4℃,8000rpm,离心15min,弃沉淀,取上清液置于冰上待测。

#### 二、测定步骤

1. 分光光度计/酶标仪预热30min以上,调节波长至340nm,蒸馏水调零。
2. 将试剂三、试剂四置于冰上待测。
3. 操作表(在微量石英比色皿/96孔UV板中操作):

试剂名称( $\mu$ L)	空白管	测定管
蒸馏水	20	-
样本	-	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

试剂一	120	120
试剂二	20	20
试剂三	20	20
试剂四	20	20

在微量石英比色皿/96孔UV板中分别加入上述试剂，充分混匀后于340nm处测定10s时的吸光值A1，迅速置于37℃水浴锅/37℃培养箱放置5min（酶标仪有控温功能的将温度调制37℃），拿出迅速擦干测定5min10s时的吸光值A2，计算  $\Delta A_{\text{测定管}} = A1_{\text{测定}} - A2_{\text{测定}}$ ， $\Delta A_{\text{空白管}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}}$ ， $\Delta A = \Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}$ 。

**注意：空白管只需测定1-2次。**

### 三、P5CS酶活计算

#### 1. 按样本蛋白浓度计算

酶活单位定义：每毫克组织蛋白每分钟消耗1nmol NADPH为一个酶活单位。

$$\text{P5CS 酶活 (U/mg prot)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 321.54 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \div d$$

#### 2. 按样本质量计算

酶活单位定义：每克组织每分钟消耗1nmol NADPH为一个酶活单位。

$$\text{P5CS 酶活 (U/g 质量)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 324.76 \times \Delta A \div W \div d$$

$\epsilon$ : NADPH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ;  $d$ : 比色皿光径,  $1\text{cm}$ ; 96孔UV板光径,  $0.6\text{cm}$ ;  $V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积,  $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ;  $C_{\text{pr}}$ : 样本蛋白浓度,  $\text{mg/mL}$ ;  $V_{\text{样}}$ : 加入反应体系中上清液体积,  $0.02\text{mL}$ ;  $V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积,  $1.01\text{mL}$ ;  $W$ : 样本质量,  $\text{g}$ ;  $T$ : 反应时间,  $5\text{min}$ ;  $10^9$ : 单位换算系数,  $1\text{mol} = 10^9 \text{ nmol}$ 。

### 注意事项:

1. 当A1测定高于1.5或者 $\Delta A$ 大于0.5时，建议将样本稀释后检测，并在计算公式中乘以稀释倍数。
2. 尽量使用新鲜样本进行检测，操作时请置于冰上操作。
3.  $\Delta A$ 空白管的数值一般不超过0.05。

### 实验实例:

取 0.1g 三叶草进行样本处理，样本稀释 2 倍，按照测定步骤操作（微量石英比色皿检测），计算得 $\Delta A_{\text{测定管}} = A1_{\text{测定}} - A2_{\text{测定}} = 1.0302 - 0.9842 = 0.046$ ， $\Delta A_{\text{空白管}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}} = 0.7431 - 0.7248 = 0.0183$ ， $\Delta A = \Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}} = 0.0277$ ，按照样本质量计算酶活得：

$$\text{P5CS 酶活 (U/g 质量)} = 324.76 \times \Delta A \div W = 179.9 \text{ U/g 质量}。$$



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