

## 吡咯啉-5-羧酸还原酶（P5CR）活性检测试剂盒（微量法）

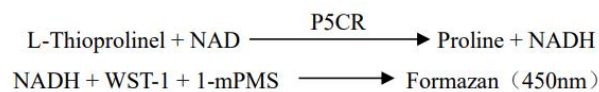
产品货号：BA2097

产品规格：100T/48S

### 产品简介：

吡咯啉-5-羧酸还原酶(pyrraline-5-carboxylate reductase, P5CR)是广泛存在于原核和真核生物中的一种重要的管家蛋白。在NAD(P)H 的作用下，吡咯啉-5-羧酸(P5C)在吡咯啉-5-羧酸还原酶作用下转化为脯氨酸，并且P5CR还被发现能够在大肠杆菌中参与到硫代脯氨酸 (Thioprolin) 的代谢过程。

硫代脯氨酸在吡咯啉-5-羧酸还原酶催化作用下脱氢，并伴随着NAD转化为NADH。在1-mPMS作用下，WST-1可与NADH反应，产生水溶性formazan，在450nm下有特征吸收峰。



**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60mL×1瓶	2-8℃
提取液二	液体600μL×1支	-20℃
试剂一	液体5mL×1瓶	2-8℃
试剂二	液体10mL×1瓶	2-8℃
试剂三	粉剂×1瓶	-20℃
试剂四	液体4mL×1瓶	2-8℃
标准品	粉剂×1支	-20℃

### 溶液的配制：

1. 提取液二：易挥发试剂，用完及时拧盖封口放回-20℃。
2. 提取液的配制：根据样本量按提取液一：提取液二=0.99mL：0.01mL（1T）的比例配制提取液，现用现配，禁止提前配制。
3. 试剂三：临用前取一支试剂三加入5.6mL试剂一，充分混匀。未用完的试剂分装保存，-20℃保存可以保存4周，避免反复冻融。
4. 标准品：临用前加入1.4mL蒸馏水，即2μmol/mL NADH标准液。未用完的试剂分装保存，-20℃可以保存2周，避免反复冻融。临用前取100μL的2μmol/mL NADH标准液于EP管中，加入700μL蒸馏水充分溶解，配制成0.25μmol/mL的NADH标准液。现用现配。

### 需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、蒸馏水和冰。

### 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）

1. 组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL提取



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

液) 进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2. 细菌或培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10<sup>4</sup> 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 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); 8000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
3. 血清 (浆) 等液体: 直接测定。(若溶液呈现浑浊, 则离心取上清后再测定)。

## 二、测定步骤

1. 可见分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 450nm, 可见分光光度计用蒸馏水调零。
2. 操作表:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	标准管	空白管
试剂二	90	90	90	90
试剂三	90	-	-	-
蒸馏水	-	90	90	110
试剂四	20	20	20	20
标准品	-	-	20	-
样品	20	20	-	-

充分混匀, 37℃避光反应显色 30min, 取 200μL 于微量玻璃比色皿或 96 孔板中, 测定在 450nm 处的吸光度。记作 A<sub>测定</sub>, A<sub>对照</sub>, A<sub>标准</sub>, A<sub>空白</sub>。ΔA<sub>测定</sub>=A<sub>测定</sub>-A<sub>对照</sub>, ΔA<sub>标准</sub>=A<sub>标准</sub>-A<sub>空白</sub>。(标准管和空白管只需做 1-2 次。)

## 三、P5CR 活性计算

- (1) 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{P5CR 活性 (U/mg prot)} = (\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 \times F = 8.333 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}} \times F$$

- (2) 按样本质量计算:

单位的定义: 每 g 组织每分钟催化产生 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{P5CR 活性 (U/g 质量)} = (\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (W \div V_{\text{样}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 \times F = 8.333 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F$$

- (3) 按细菌或细胞数目计算

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{P5CR 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = (\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (500 \div V_{\text{样}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 \times F = 0.0167 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F$$

- (4) 按血清 (浆) 等液体体积计算

单位的定义: 每 mL 血清 (浆) 等液体每分钟催化产生 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{P5CR 活性 (U/mL)} = (\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T \times 10^3 \times F = 8.333 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F$$

C<sub>标准</sub>: NADH 标准液的浓度, 0.25μmol/mL; V<sub>样</sub>: 反应体系中加入的样本体积, 0.02mL; V<sub>样总</sub>: 加入的提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 30min; C<sub>pr</sub>: 蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细胞或细菌数目, 500 万; 10<sup>3</sup>: 单位换算系数, 1μmol/mL=10<sup>3</sup>nmol/mL; F: 样本稀释倍数。

## 注意事项:

1. 如果 A<sub>测定</sub> 大于 1.8 或者 ΔA<sub>测定</sub> 大于 1, 可以减少样品量或者缩短反应时间; 若 ΔA<sub>测定</sub> 小于 0.01, 可以增加样品量或者延长反应时间至 1h 或者更长时间。计算公式注意同步修改。



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