

# 吡咯啉-5-羧酸还原酶 (P5CR) 活性检测试剂盒 (可见分光光度法)

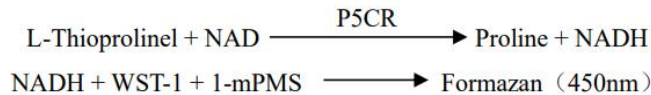
产品货号: BA2096

产品规格: 50T/24S

## 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30mL×1瓶	2-8℃
提取液二	液体300μL×1支	-20℃
试剂一	液体15mL×1瓶	2-8℃
试剂二	液体30mL×1瓶	2-8℃
试剂三	粉剂×1瓶	-20℃
试剂四	液体8mL×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: 临用前加入14mL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50μL的2μmol/mL NADH标准液于EP管中, 加入750μL蒸馏水充分溶解, 配制0.125μmol/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、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液器、分析天平、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、1mL 玻璃比色皿、蒸馏水和冰。



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

### 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. 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 450nm，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	450	450	450	450
试剂三	450	-	-	-
蒸馏水	-	450	450	550
试剂四	100	100	100	100
标准溶液	-	-	100	-
样品	100	100	-	-

充分混匀，37℃避光反应显色 30min，取 1000μL 于 1mL 玻璃比色皿中，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。

$$P5CR \text{ 活性 (U/mg prot)} = (\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 \times F = 4.167 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}} \times F$$

##### (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。

$$P5CR \text{ 活性 (U/g 质量)} = (\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (W \div V_{\text{样}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 \times F = 4.167 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F$$

##### (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。

$$P5CR \text{ 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = (\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (500 \div V_{\text{样}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 \times F = 0.0083 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F$$

##### (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。

$$P5CR \text{ 活性 (U/mL)} = (\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T \times 10^3 \times F = 4.167 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F$$

C<sub>标准</sub>：NADH 标准液的浓度，0.125μmol/mL；V<sub>样</sub>：反应体系中加入的样本体积，0.1mL；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 1.5 或者 ΔA<sub>测定</sub> 大于 0.8，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，可以加大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