

吡咯啉-5-羧酸合成酶 (P5CS) 试剂盒说明书

微量法 100 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

脯氨酸是植物体内适应逆境胁迫的一种重要的渗透调节物质。高等植物中脯氨酸代谢因其初始底物不同，分为谷氨酸 (Glu) 和鸟氨酸 (Orn) 两条合成途径。吡咯啉-5-羧酸合成酶 (P5CS, Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase) 是以谷氨酸为前体合成脯氨酸途径的关键酶，对植物适应逆境胁迫起关键作用。

测定原理：

吡咯啉-5-羧酸合成酶催化谷氨酸生成 P5C 过程中分解 ATP 生成 ADP 和无机磷，通过钼酸铵比色法测定单位时间内产生无机磷的量可确定 P5CS 活性。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 60 mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：液体 12 mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂三：液体 12 mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂四：粉剂×1 瓶，4℃ 保存，用时加入 25 mL 蒸馏水，溶解后 4℃ 保存一周；

试剂五：粉剂×1 瓶，4℃ 保存，用时加入 25 mL 蒸馏水，溶解后 4℃ 保存一周；

试剂六：液体 25 mL×1 瓶，室温保存；

试剂七：10 mmol/L 标准磷储备液 10 mL×1 瓶，4℃ 保存。

0.5 μmol/mL 标准磷应用液配制：将试剂七 20 倍稀释，即取 0.1 mL 试剂七加 1.9 mL 蒸馏水充分混匀。

定磷剂的配制：按 H₂O: 试剂四: 试剂五: 试剂六=2:1:1:1 的比例配制，配好的定磷剂应为浅黄色。若无色则试剂失效，若是蓝色则为磷污染，定磷剂现用现配。

注意：配试剂最好用新的烧杯、玻棒和玻璃移液器，也可以用一次性塑料器皿，避免磷污染。

样品酶液的制备：

1、组织样品：按照组织质量 (g)：试剂一体积 (mL) 为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1 g 组织，加入 1 mL 试剂一），进行冰浴匀浆。8000g 4℃ 离心 10 min，取上清，置冰上待测。

2、血清（浆）样品：直接检测。

操作步骤

1、分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 660 nm。

2、酶促反应（在 EP 管中加入下列试剂）

	对照管	测定管
试剂二 (μL)		100
样本 (μL)		100

混匀，37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）准确水浴 10 min

试剂三 (μL)	100	100
试剂二 (μL)	100	
样本 (μL)	100	

混匀, 8000g, 25℃ 离心 10min, 取上清液

3、定磷 (在 EP 管或 96 孔板中加入下列试剂)

	空白管	标准管	对照管	测定管
0.5μmol/ml 标准磷应用液 (μL)		20		
上清液 (μL)			20	20
蒸馏水 (μL)	20			
定磷试剂 (μL)	200	200	200	200

混匀, 室温放置 30min, 在 660nm 处, 记录各管吸光值。

注意:

- 1、由于每一个样都必须做对照, 本试剂盒 100 管保证测 48 份 P5CS 活性。
- 2、此法具有微量、灵敏、快速的特点。所以对测定所用试管要求严格无磷。
- 3、空白管和标准管只要做一管。每个测定管设一个对照管。

计算

1、血清 (浆) P5CS 活力的计算:

单位定义: 每小时每毫升血清 (浆) 中 P5CS 消耗 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{P5CS 活力} (\mu\text{mol/h/mL}) = \frac{C \text{ 标准管} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管})}{(A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V \text{ 总}} \div V \text{ 样} \div T = 9 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})$$

2、组织中 P5CS 活力的计算:

(1) 按蛋白浓度计算:

单位定义: 每小时每毫克组织蛋白中 P5CS 消耗 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{P5CS 活力} (\mu\text{mol/h/mg prot}) = \frac{C \text{ 标准管} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管})}{(A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V \text{ 总}} \div (C_{\text{pr}} \times V \text{ 样}) \div T = 9 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算:

单位定义: 每小时每克组织中 P5CS 消耗 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{P5CS 活力} (\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = \frac{C \text{ 标准管} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管})}{(A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V \text{ 总}} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 9 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div W$$

C 标准管: 标准管浓度, 0.5μmol/mL; V 总: 酶促反应总体积, 0.3mL; V 样: 加入样本体积, 0.1mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 1/6 小时; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本鲜重, g。