

脯氨酸脱氢酶 (Proline dehydrogenase, ProDH)试剂盒说明书

微量法 100 管/96 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:

ProDH 是存在于线粒体内的催化脯氨酸降解的关键酶。脯氨酸是分布最广泛的一种渗透物质, 在胁迫条件下很多植物可以通过增加合成、减少降解而在体内累积大量脯氨酸, 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。

测定原理:

利用异硫氰酸甲酯检测 ProDH 催化的脱氢反应, 600nm 处吸光值的吸光值的变化反映酶活性的高低。

需自备的仪器和用品:

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

试剂的组成和配制:

提取液: 100mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂一: 液体 2 mL×1 支, 4℃ 保存;

试剂二: 液体 25mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂三: 粉剂×1 瓶, 4℃ 保存; 临用前加入 4mL 蒸馏水充分溶解待用, 用不完的试剂 4℃ 保存;

试剂四: 粉剂×1 瓶, 4℃ 保存; 临用前加入 4mL 蒸馏水充分溶解待用, 用不完的试剂 4℃ 保存;

试剂五: 粉剂×4 支, 4℃ 保存;

粗酶液提取:

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 样本, 加入 1mL 提取液), 进行冰浴匀浆, 1500g 4℃ 离心 15min, 取上清液于一支新的 EP 管中, 加入一滴试剂一 (用 10 μL 的枪头加入), 涡旋混匀, 冰浴放置 30min 后, 16000g 4℃ 离心 20min, 取上清置冰上待测。

测定步骤:

1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 600nm, 蒸馏水调零。

2、样本测定

(1) **混合液的配制:** 首先将试剂三和试剂四配成溶液 (见试剂的组成和配制), 临用前根据用量按照试剂二 (V): 试剂三 (V): 试剂四 (V) = 2.4 (mL): 0.3 (mL): 0.3 (mL) 的比例充分混匀。(注意: 现配现用, 用多少配多少), 置于 30℃ 水浴 5min;

(2) 试剂五的配制: 取试剂五一支, 临用前加入 500 μL 蒸馏水充分溶解待用, 现配现用。

(3) 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 35 μL 样本、15 μL 试剂五和 150 μL 混合液, 混匀, 立即记录 600nm 处初始吸光值 A1 和 10min 后的吸光值 A2, 计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

ProDH 活性计算：**a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下**

(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。

$$\text{ProDH (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div 0.01 \div T = 57.14 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算：

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。

$$\text{ProDH (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 57.14 \times \Delta A \div W$$

V 反总：反应体系总体积，0.2mL； V 样：加入样本体积，0.035mL； V 样总：加入提取液体积，1 mL； T：反应时间，10 min； Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； W：样本质量，g。

b.用 96 孔板测定的计算公式如下

(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。

$$\text{ProDH (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div 0.005 \div T = 114.29 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算：

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。

$$\text{ProDH (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.005 \div T = 114.29 \times \Delta A \div W$$

V 反总：反应体系总体积，0.2mL； V 样：加入样本体积，0.035mL； V 样总：加入提取液体积，1 mL； T：反应时间，10 min； Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； W：样本质量，g。